

**XI НАЦИОНАЛЬНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
«ПИЩЕВАЯ И МОРСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ»**

**XI NATIONAL RESEARCH AND PRACTICAL CONFERENCE
WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION
"FOOD AND MARINE BIOTECHNOLOGY"**

**СОДЕРЖАНИЕ
CONTENS**

<i>Аверьянова Е.В., Школьникова М.Н., Рожнов Е.Д.</i> Повышение эффективности пищевой добавки на основе флавоноидов облепихи	3
<i>Анохова В.Д., Буденкова Е.А., Бабич О.О.</i> Микроводоросли как потенциальный источник биологически активных полисахаридов.....	7
<i>Баженов Е.А., Байдалинова Л.С.</i> Направления производства и использования пищевых ферментных препаратов в зарубежной практике	12
<i>Борисова А.В., Шабанова П.В.</i> Разработка активных биоразлагаемых упаковочных пленок с эфирными маслами	20
<i>Гаврилова А.А., Землякова Е.С.</i> Исследования по технологии порошкообразных продуктов питания повышенной пищевой ценности.....	29
<i>Гендриксон О.Д., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.</i> Разработка подходов для высокочувствительной иммунохроматографической детекции акватоксинов в воде и пищевых продуктах	39
<i>Дышлок Л.С., Хильшер М.С.</i> Антиоксидантный потенциал экстрактов микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	49
<i>Журавлева О.В.</i> Исследование культивирования бифидобактерий на биогеле из сахарины <i>Saccharina japonica</i>	55
<i>Зарубин Н.Ю., Бредихина О.В., Лаврухина Е.В., Гриневич А.И.</i> Продукты биотрансформации аккумулированных отходов от разделки рыб	62
<i>Каменская Е.П., Колесниченко М.Н., Дикалова Е.С.</i> Использование ферментных препаратов при затирании зернопродуктов в технологии получения концентрированных основ	68
<i>Киселёва Е.Э., Землякова Е.С.</i> Технология мучных кондитерских изделий повышенной пищевой ценности	72
<i>Клипак М.Б., Слуцкая Т.Н.</i> Влияние первичной обработки кожи минтая на содержание коллагена	79
<i>Ключко Н.Ю., Позднякова Д.А., Ковалева Е.Д.</i> Использование рыбной белково-минеральной композиции для обогащения хлебобулочных и мучных кондитерских изделий.....	84
<i>Ларина В.В., Бахтиярова А.Х., Бабич О.О.</i> Подбор параметров экстракции и скрининг биологической активности ольхи серой (<i>Alnus Incána</i>).....	90
<i>Ларина В.В., Чупахин Е.Г., Бабич О.О., Бахтиярова А.Х.</i> Получение индивидуальных БАВ и фитохимический состав экстрактов <i>Melilotus officinalis</i> в зависимости от рН экстрагента.....	96
<i>Лютлова Е.В., Сутугин М.А., Лесько Е.С.</i> Маркетинговые исследования по изучению спроса на рыбные формованные изделия	101
<i>Лях В.А., Хасиева А.Д., Шаманская А.А.</i> Обогащенные хлебобулочные изделия с добавлением продуктов переработки нерыбных объектов водного промысла для профилактического питания.....	106

<i>Максимова С.Н., Полещук Д.В., Подленный Л.Ю.</i> Применение хитозана при предварительной обработке отходов икорного производства	112
<i>Мащенко З.Е., Русских Я.М., Бахарев В.В.</i> Влияние эритромицина в различных лекарственных формах на видовой состав активного ила.....	116
<i>Мезенова О.Я., Андреева Е.В., Jörg-Thomas Mörsel.</i> Перспективы использования низкомолекулярных пептидов вторичного шпротного сырья в производстве соусной продукции.....	120
<i>Мезенова О.Я., Пьянов Д.С., Агафонова С.В., Романенко Н.Ю., Волков В.В., Калинина Н.С.</i> Об использовании нерастворимых продуктов гидролиза шпротных отходов в комбикормах для лососевых.....	127
<i>Пивненко Т.Н., Позднякова Ю.М., Есипенко Р.В.</i> Глубоководные виды рыб семейства макрурид как перспективные объекты промысла и переработки	131
<i>Рысакова К.С., Новиков В.Ю., Шумская Н.В.</i> Выделение и фракционирование хитиноподобных ферментов из гепатопанкреаса камчатского краба	137
<i>Самбурская Н.В., Мезенова О.Я., Томас Мерзель.</i> Использование красных водорослей в составе бездымных копильных сред для копчения рыбы.....	147
<i>Суняйкина А.В., Агафонова С.В.</i> Оптимизация рецептуры безглютенового хлебобулочного изделия на основе рисовой муки	153
<i>Сушина А.Д., Мезенова О.Я.</i> Исследование реологических характеристик копильно-водорослевой композиции при приготовлении рыбы горячего копчения.	158
<i>Тихонов С.Л., Кольберг Н.А., Тихонова Н.В., Лазарев В.А.</i> Влияние пептидов животного происхождения на общую клеточность костного мозга и миелограмму иммунодефицитных мышей	165
<i>Федоренко Д.Д., Агафонова С.В.</i> Совершенствование рецептуры кисломолочного мороженого без сахара, обогащенного пребиотиками	173
<i>Чмыхалова В.Б., Ефимова М.В., Ефимов А.А.</i> Использование отходов производства икорной продукции из тихоокеанских лососевых рыб как рецептурного ингредиента эмульсионных продуктов.....	180

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ФЛАВОНОИДОВ ОБЛЕПИХИ

¹Аверьянова Елена Витальевна, канд. хим. наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии

²Школьников Марина Николаевна, д-р техн. наук, доцент, профессор кафедры технологии питания

³Рожнов Евгений Дмитриевич, д-р техн. наук, профессор кафедры биотехнологии

^{1,2,3}Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Алтайский край, Россия, e-mail: ¹averianova.ev@bti.secna.ru; ³red@bti.secna.ru

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», Екатеринбург, Россия, e-mail: ²shkolnikova.m.n@mail.ru

Рассмотрены вопросы повышения эффективности природной пищевой добавки консервирующего действия, полученной из крупнотоннажного отхода производства облепихового масла – шрота. На основе массива экспериментальных данных выявлена зависимость содержания частиц, оптимального для усвоения в ЖКТ диаметра 1,4–1,8 мкм от мощности, концентрации и продолжительности микронизации. Определены оптимальные параметры ультразвукового воздействия, флавоноидный состав добавки и ее антибактериальная активность в отношении ряда микроорганизмов.

Введение

На сегодняшний день термин «функциональные пищевые ингредиенты» (ФПИ) прочно вошел в практику пищевой промышленности при производстве функциональных, специализированных, обогащенных продуктов питания и БАД к пище, что обусловлено доказанным терапевтическим потенциалом широкого перечня ФПИ. В этой связи можно говорить о фармацевтических свойствах микроингредиентов, среди которых особое место занимают ФПИ растительного происхождения.

По оценкам исследовательской компании *Mintel*, тенденция развития мирового рынка продуктов питания и БАД к пище на растительной основе является приоритетной в связи с наметившимся глобальным трендом *Power to the plants* («Сила растений») [1].

В этом ключе безотходная переработка плодоовощной продукции является мировой тенденцией, ориентирующей производителей на технологии глубокой конверсии растительного сырья, в том числе методами биотехнологии, с получением ценных биологически активных веществ высокого качества для использования в качестве пищевых ингредиентов и БАД к пище. Так наиболее ценными компонентами крупнотоннажного отхода фармацевтического производства облепихового шрота являются флавоноиды, проявляющие широкий спектр биологической активности при отсутствии токсичности, что позволяет рассматривать облепиховый шрот как перспективное сырье для получения эффективного пищевого ингредиента, проявляющего функциональные свойства [2]. Однако высокая гидрофобность этого класса соединений ограничивает их использование для целого ряда продуктов питания с преобладанием водной фазы.

В связи с этим целью настоящего исследования является научное обоснование и экспериментальное подтверждение эффективности способа микронизации для повышения растворимости биофлавоноидов облепихового шрота.

Основная часть

Для повышения биодоступности БАВ растительного происхождения, в частности флавоноидов, применяются различные технологические приемы. Однако, на сегодняшний день единственным методом, повышающим биодоступность флавоноидов, является микронизация физическими

методами с использованием высокотехнологичного оборудования, в то время как традиционное измельчение (например, гранулирование) не оказывает влияния на физиологическую активность и их абсорбцию в ЖКТ. Повышение растворимости флавоноидов приводит к усилению антиоксидантной активности, а также Р-витаминного действия [3].

В связи с этим за основу взят метод микронизации, при реализации которого в лабораторных условиях подобраны оптимальные режимы и параметры волнового (ультразвук) воздействия, необходимые для разработки эффективного пищевого ингредиента на основе флавоноидной фракции облепихового шрота. С этой целью рассмотрены следующие режимы ультразвуковой микронизации: частота ($22 \pm 1,65$) кГц; интенсивность не менее 10 Вт/см²; мощность (номинальная) 30, 50, 75 и 100 Вт, продолжительность воздействия 3, 5, 10 и 15 мин. Концентрация флавоноидов в водной суспензии составляла 0,5%.

Подсчет диаметра и процентное содержание фракции производился по методике [4]. После каждой обработки раствора ультразвуком была измерена температура термометром для предотвращения деградации полифенольных веществ (не более 70 °С).

Данные, полученные при исследовании микронизации водных суспензий флавоноидов в условиях кавитации представлены на рисунке 1.

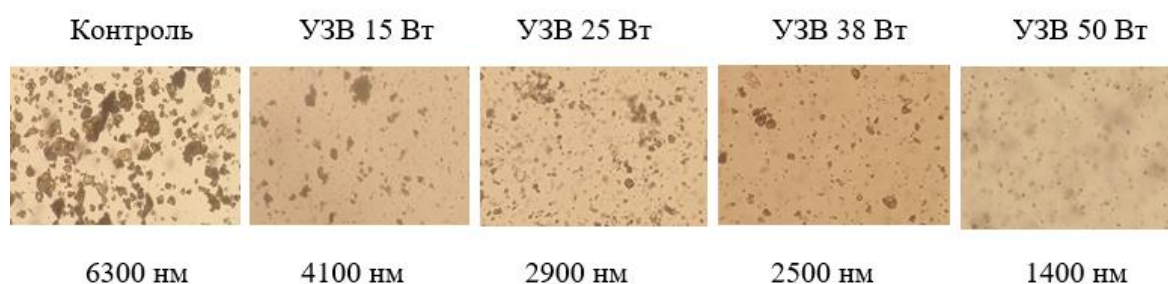


Рис. 1. Динамика изменения микроструктуры флавоноидной фракции в 0,5 %-ой суспензии в зависимости от мощности УЗВ продолжительностью 10 мин

На микрофотографиях рисунка 1 видно, что частицы флавоноидов представляют собой структуру изометрической формы (сфера, правильные многогранники).

На графике рисунка 2 представлена зависимость распределения частиц по размеру от мощности и продолжительности ультразвукового воздействия.

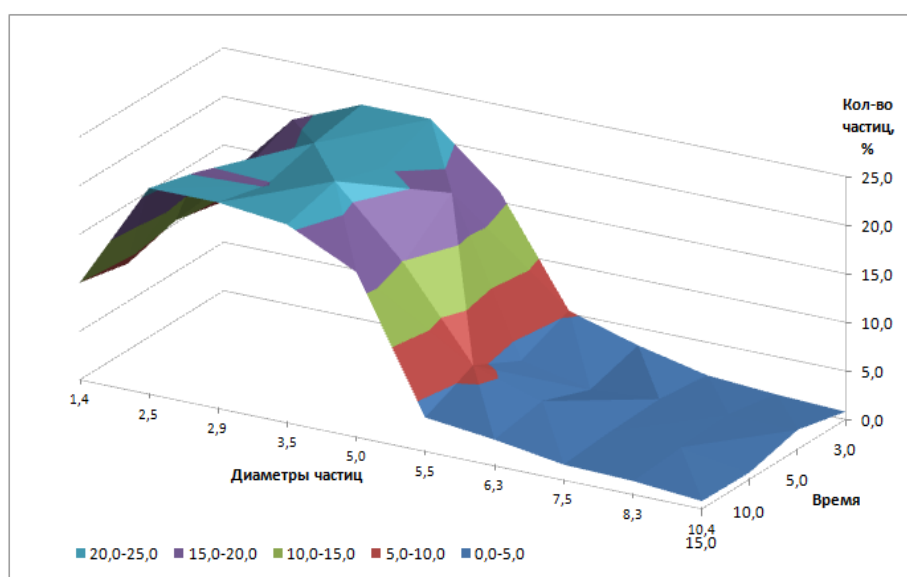


Рис. 2. Результаты микронизации 0,5%-ой суспензии флавоноидов облепихового шрота

Согласно данным рисунка 2 оптимальными условиями получения микронизированной фракции с максимальным количеством частиц размером 1,4-1,8 мкм, является: мощность УЗ-воздействия 50 Вт, продолжительность 10 мин. При этом наибольшее влияние оказывает мощность и продолжительность озвучивания суспензии, а температура процесса, увеличивающаяся за счет кавитационных процессов в массе, не оказывает существенного влияния на размер частиц суспензии.

Для выявления оптимальных условий обработки растворов флавоноидной фракции с целью добиться значений параметров, дающих максимальное содержание частиц диаметром 1,4-1,8 мкм был спланирован и реализован полный факторный эксперимент. В качестве факторов варьирования приняты: X_1 – мощность УЗ-воздействия, Вт; X_2 – концентрация флавоноидов в суспензии, %; X_3 – продолжительность обработки, мин. Критерий оптимизации Y – размер частиц диаметром 1,4-1,8 мкм. На основании проведенных расчетов выявлена зависимость содержания частиц диаметром 1,4-1,8 мкм (Y) от мощности (X_1), концентрации (X_2) и продолжительности микронизации (X_3), которая описывается следующим уравнением регрессии:

$$Y=15,48+5,9X_1-0,8X_2+2,7X_3+0,3X_{13}+X_{123} \quad (1)$$

На основе уравнения регрессии построен трехмерный график (рис. 3).

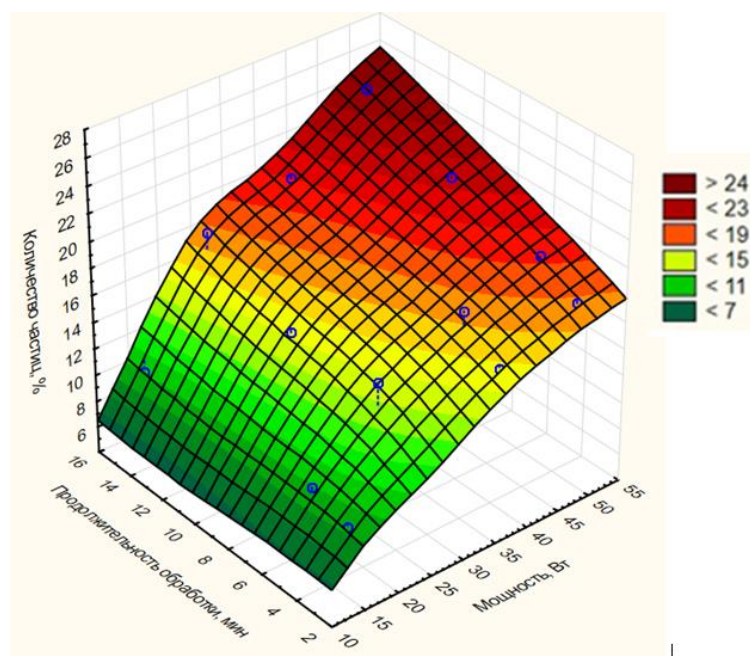


Рис. 3. Зависимость количества частиц номинального размера от продолжительности и мощности УЗВ

Методом ВЭЖХ в составе комплекса флавоноидов облепихового шрота обнаружены рутин, нарциссин, мирицетин, кемпферол, кверцетин и изорамнетин, с преобладанием кверцетина и изорамнетина. 34,3 % и 64,2 %, соответственно.

Антимикробная активность микронизированной флавоноидной фракции облепихового шрота в опытах *in vitro* в отношении патогенных грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 10231 проявила бактериостатический эффект в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 в концентрации 3000 мкг/мл и 2000 мкг/мл, соответственно, и фунгистатическую активность в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 10231 в концентрации 3000 мкг/мл.

По результатам товароведческого анализа образец микронизированной флавоноидной фракции облепихового шрота по показателям безопасности соответствует требованиям – ТР ТС 021/2011; получен в виде однородного тонкодисперсного порошка коричнево-желтого цвета, нейтрального вкуса, без запаха и посторонних примесей, с содержанием основного вещества (флавоноидов) не

менее 96 %, влажностью порядка 5 %, зольность – 0,04 %, токсичные элементы и посторонняя микрофлора не обнаружены, что свидетельствует не только о высоком качестве полученного образца, но и проявляемом антибактериальном эффекте фенольных веществ и УЗ-обработки.

Заключение

На основании серии экспериментальных опытов подобраны оптимальные режимы микронизации очищенной флавоноидной фракции для дальнейшего использования в производственных процессах; образец микронизированной флавоноидной фракции облепихового шрота может быть рекомендован для использования, как в качестве пищевой биологически активной добавки Р-витаминного действия, так и в качестве природного консерванта, подавляющего развитие посторонней микрофлоры в продукте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В тренде здорового питания. Рынок продуктов на растительной основе занимает свое законное место – Текст: электронный // Газета «Коммерсантъ», 25 апреля 2019. – URL: <https://www.kommersant.ru/doc/3953712>
2. Исследование биологической активности флавоноидов облепихового шрота с применением специфических биотест-систем / Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьникова, Е.Д. Рожнов, Д.В. Минаков, Е.С. Баташов, Б.К. Шаихова //Химия растительного сырья. – 2020. – №. 4. – С. 235-241.
3. Воронков А.В., Гамзелева О.Ю. Обзор современных флеботропных препаратов на основе флавоноидов как перспективных эндотелиопротекторов при лечении хронических заболеваний вен // Амбулаторная хирургия. 2019. 1-2. С. 27-33.
4. Количественный учет микроорганизмов: методические рекомендации / Е.П. Каменская, Е.В. Аверьянова. – Бийск: Изд-во Алт. гос. тех. ун-т, 2007. – 35 с.

INCREASING THE EFFICIENCY OF A FOOD ADDITIVE BASED ON SEA BUCKTHORN FLAVONOIDS

¹Averyanova Elena Vitalevna, Candidate of Chemistry Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Biotechnology Department

²Shkolnikova Marina Nikolaevna, Doctor of Technical Sciences, Associate professor, Professor of the Nutrition Technology

³Rozhnov Evgeniy Dmitrievich, Doctor of Technical Sciences, Professor of the Biotechnology Department

^{1,2,3}Biysk Technological Institute (subdivision of the Altay State Technical University n.a. Ivan I. Polzunov), Biysk, Russian Federation, e-mail: ¹averianova.ev@bti.secna.ru; ³red@bti.secna.ru

²Ural State University of Economics, Ekaterinburg, Russian Federation, e-mail: ²shkolnikova.m.n@mail.ru

The issues of increasing the efficiency of a natural food additive with a preservative action, obtained from a large-tonnage waste from the production of sea buckthorn oil – meal, are considered. On the basis of an array of experimental data, the dependence of the content of particles of the optimal diameter for assimilation in the gastrointestinal tract of 1.4–1.8 μm on the power, concentration and duration of micronization was revealed. The optimal parameters of ultrasonic exposure, the flavonoid composition of the additive and its anti-bacterial activity against a number of microorganisms were determined.

МИКРОВОДОРОСЛИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

¹Анохова Вероника Дмитриевна, аспирант

²Буденкова Екатерина Александровна, мл. научн. сотрудник

³Бабич Ольга Олеговна, д-р техн. наук

^{1,2,3}ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта»,
Калининград, Россия, e-mail: post@kantiana.ru

*В исследовательской работе впервые осуществлен подбор параметров спиртовой экстракции экзополисахаридов *Chlorella zofingiensis*, *Vischeria punctata*, *Euglena gracilis Klebs*, *Chlorella protothecoides*, обладающих биологически активными свойствами, с помощью различных экстрагентов (этанол, бутанол и изопропиловый спирт), а также с варьированием температуры экстракции. Выбранные водоросли выращивались в питательных средах, рекомендованных IPPAS.*

Микроводоросли – это фотосинтезирующие микроорганизмы, которые превращают солнечный свет, CO₂ и питательные вещества в биомассу, в которой накапливают различные полезные соединения, в основном состоящие из углеводов, белков и липидов и других биологически активных веществ, таких как антибиотики, каротиноиды и стероиды и др. Наибольший интерес вызывают полисахариды микроводорослей, в связи с тем, что они обладают экологически безопасными свойствами и применениями, таким как нетоксичные антиоксиданты и противоопухолевые соединения [1].

Экзополисахариды (ЭПС) микроводорослей представляют собой линейные или разветвленные макромолекулы, секретируемые микроорганизмами в виде слизи или связанные с клеточной поверхностью. В последние десятилетия были исследованы и изучены ЭПС из различных микробных источников [1-3]. В этой связи перспективным является изучение содержания полисахаридов в микроводорослях и способах их экстракции с максимальным выходом.

Материалы и методы

Культивирование микроводорослей

Культивирование микроводорослей проводили (*Chlorella zofingiensis*, *Vischeria punctata*, *Euglena gracilis Klebs*, *Chlorella protothecoides*) в фотобиореакторе BioFlo 120 series (Eppendorf SE, Germany) на питательных средах, рекомендованных IPPAS (http://cellreg.org/Catalog_2020/media_list.html): BBM для *Chlorella zofingiensis* (C-108), Прата для *Vischeria punctata* (H-242) и видоизмененная (без добавления витаминов B₁, B₁₂ и биотина) питательная среда для *Euglena* (E-199), среда для *Chlorella protothecoides* для *Chlorella protothecoides* (C-50).

Исходная концентрация клеток в культуральной жидкости – 0,2-0,3 г/л. Культивирование проведено при фотопериоде 12 ч свет/темнота при 28 °С и постоянном перемешивании 100 об/мин на протяжении 21 суток. Освещение с интенсивностью 75±5 ммоль фотонов м⁻² с⁻¹ обеспечено лампами Tetronic Led ProLine (German) с белыми и красными диодами (8:1). Аэрирование проводилось атмосферным воздухом (~1,5 л/мин). Эксперименты проведены в нестерильных условиях.

Определение биомассы микроводорослей

Для оценки прироста биомассы в течение 21 суток с интервалом 72 часа отбирали образцы и проверяли уровень абсорбции при 750 нм на фотометре КФК-ЗКМ (Россия).

Количественное определение полисахаридов

В каждую лунку микропланшета, содержащую 50 мкл образцов добавить 150 мкл антронного агента (0,1% раствор перекристаллизованного антрона, НеваРеактив, Россия, в концентрированной серной кислоте, Вектон, Россия). Затем планшеты поместили на 10 минут при 4С. После охлаждения инкубировали 20 минут при 70С. После нагревания охладили до комнатной температуры. Измеряли оптическую плотность при 620 нм на считывателе планшетов ClarioStar, LabTech, Германия. Стандартную кривую строили по растворам сахарозы.

Спиртовое осаждение экзополисахаридов

Культуральную среду с клетками микроводорослей центрифугировали в Centrifuge 5810 (Eppendorf, Германия) при 3900 об/мин в течение 20 минут, супернатант собирали и фильтровали через бумажный фильтр с порами 2-3 мкм. Фильтрат смешивали с различными спиртами (этанол, бутанол (ЭКОС.1, Россия), изопропанол (Вектон, Россия)) в различных соотношениях (1:1, 1:2, 1:3) и оставляли осаждаться в течение 12 ч. при разных температурах (30°C, 20°C, 10°C, 0°C, -10°C, -20°C, -30°C). После осаждения, растворы центрифугировались при 3900 об/мин, супернатант сливали, а осадок сушили в лиофильной сушке (Labconco, США) в течение 12 ч. при -20°C, при давлении 0,350 мБар. После сушки выход выделенных полисахаридов определяли гравиметрически.

Статистический анализ

Все опыты и измерения проведены трехкратно. Результаты исследования представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Для проверки статистически значимого межгруппового различия проведен дисперсионный анализ ANOVA, затем использованы параметрические критерии Стьюдента и Тьюки. Наличие статистически значимого различия принималось при условии $p < 0.05$ при доверительном интервале 95%. Статистический анализ проведен с использованием программы IBM SPSS Statistics, графики построены в программе Excel 2016.

Результаты и обсуждения

Для получения экзополисахаридов проводили культивирование микроводорослей (*Chlorella zofingiensis*, *Vischeria punctata*, *Euglena gracilis Klebs*, *Chlorella protothecoides*) в фотобиореакторе BioFlo 120 series (Eppendorf SE, Germany) на питательных средах, рекомендованных IPPAS.

Прирост биомассы регистрировали в течение 21 суток с интервалом 72 часа. На рисунке 1 изображена кривая прироста и концентрации и прироста биомассы и концентрации экзополисахаридов микроводорослей.

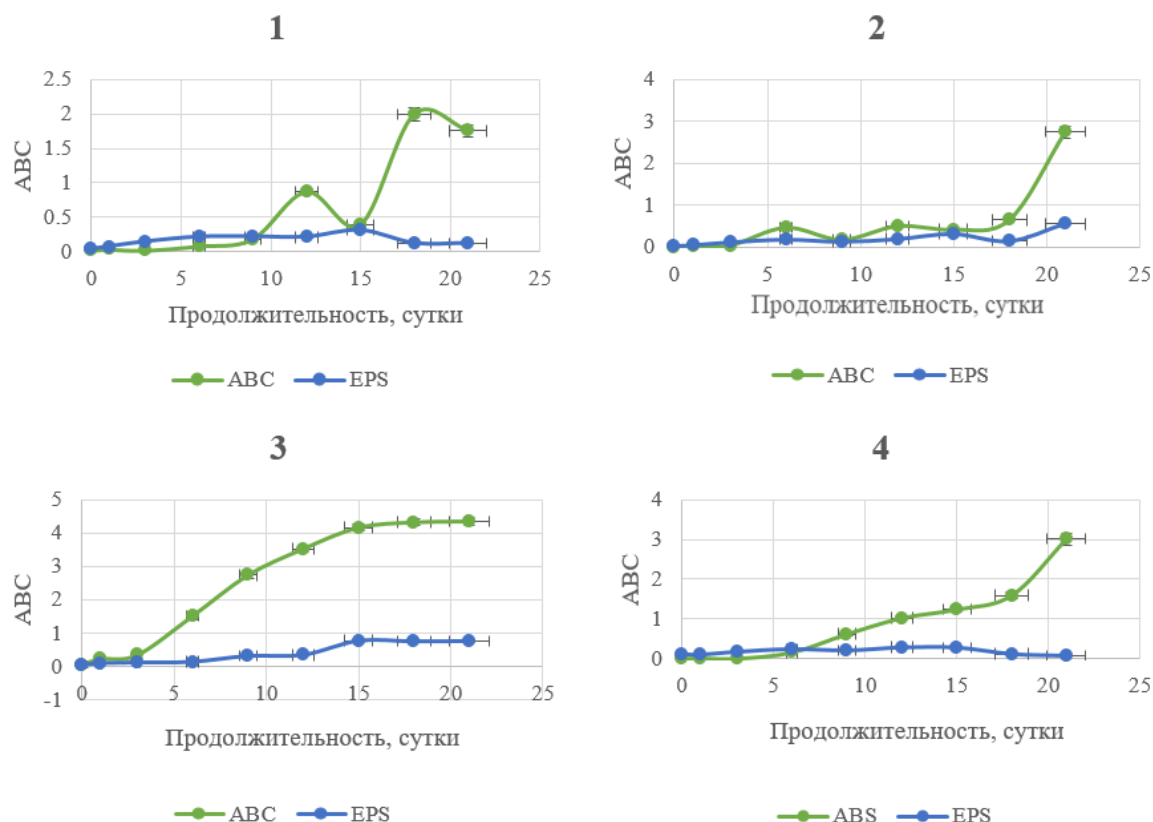


Рис. 1. Соотношение прироста биомассы и концентрации экзополисахаридов культуральной жидкости микроводорослей. 1 - *Vischeria punctata* (H-242), 2 - *Euglena* (E-199), 3 - *Chlorella zofingiensis* (C-108), 4 - *Chlorella protothecoides* (C-50).

Эмпирические данные показали, что прирост биомассы *Euglena* (E-199) коррелирует с увеличением концентрации экзополисахаридов, когда как у микроводоросли *Chlorella protothecoides* (C-50) наблюдается спад концентрации экзополисахаридов при резком приросте биомассы. У *Vischeria punctata* (H-242) значение концентрации экзополисахаридов не зависит от прироста биомассы по полученным значениям. Микроводоросль *Chlorella zofingiensis* (C-108) при приросте биомассы показывает незначительный, но прирост экзополисахаридов в культуральной жидкости. На рисунке 2 показаны фотографии микроводорослей со светового микроскопа.

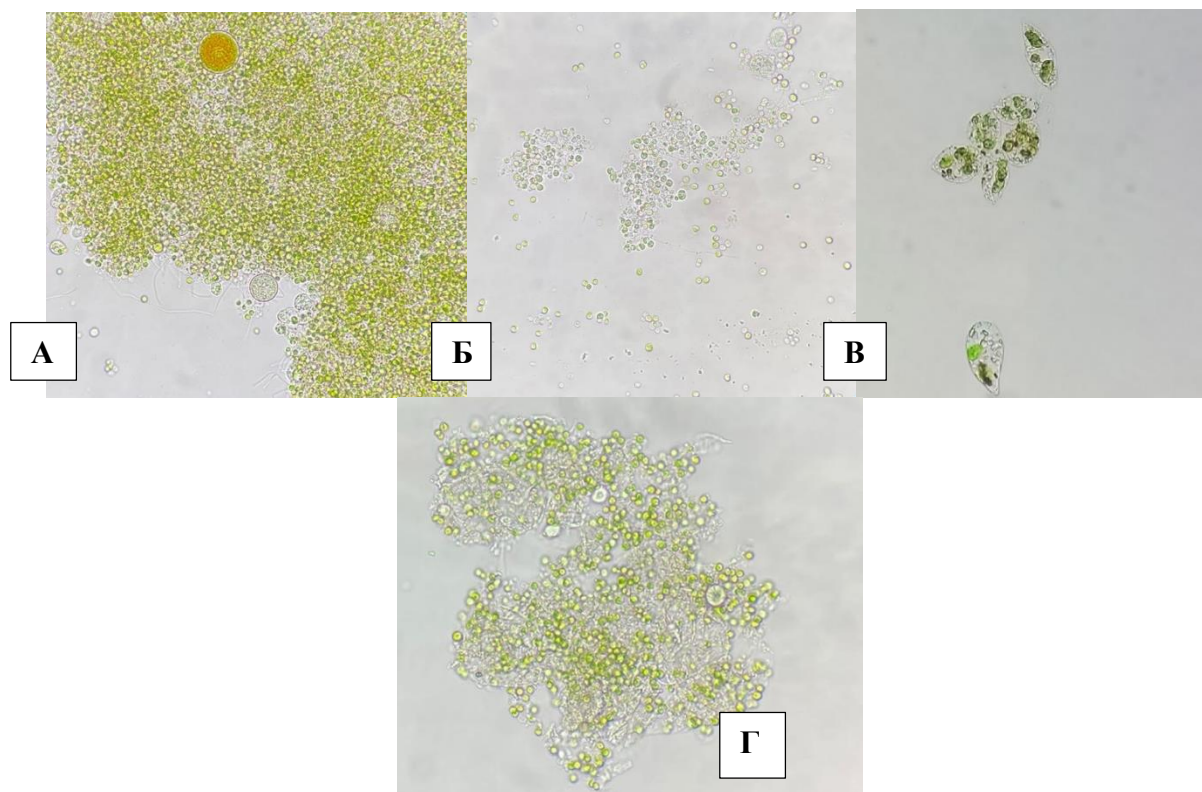


Рис. 2. Фотографии микроводорослей **А** - *Chlorella zofingiensis*, **Б** - *Vischeria punctata*, **В** - *Euglena gracilis* Klebs, **Г** - *Chlorella protothecoides*, со светового микроскопа Optika B-192 (Optika, Italy).

Далее, отделяли культуральную жидкость от биомассы микроводорослей центрифугированием и фильтрованием.

Экзополисахариды, как правило, экстрагируют из культуральной жидкости спиртовыми растворами. Учитывая то, что массовый выход целевого продукта напрямую зависит от физических факторов и растворителя, в своей работе мы подбирали параметры экстракции. В связи с тем, что тотальный выход целевого продукта зависит от длины радикала и разветвленности цепи экстрагента, рассмотрены в качестве основных растворителей этанол, бутанол-1 и изопропиловый спирт (ЗАО «Реахим», Россия) [4]. Температура экстракции также может повлиять на выход, так как различные температуры влияют на константу распределения экстрагируемого вещества. Процесс экстракции вели при различных температурных режимах от минус 30 до 30 °С.

Полученный фильтрат смешивали в разных соотношениях с разными спиртами и экстрагировали в течение 12 часов при разных температурах. После экстракции растворы центрифугировали при 3500 об/мин в течение 15 минут, собирали осадок и определяли массу выхода гравиметрически. Результаты полученных экспериментов показаны в таблице 1.

Таблица 1.

Выходы экзополисахаридов при подборе параметров экстракции

Растворитель	Чистота растворителя, (%)	Модуль экстракции (образец:спирт)	Температура осаждения, С°	Выход, мг/мл			
				<i>Vischeria punctata</i>	<i>Chlorella zofingiensis</i>	<i>Euglena gracilis Klebs</i>	<i>Chlorella protothecoides</i>
Этиловый спирт	96	1:1	20	0,07 ± 0,01	0,21±0,06	0,42±0,12	0,65±0,16
			10	0,12 ± 0,01	0,16±0,13	0,31±0,11	0,61±0,
			0	0,12 ± 0,01	0,19±0,02	0,00	0,53±0,13
			-10	0,17 ± 0,02	0,07±0,01	0,00	0,44±0,21
			-20	0,12 ± 0,01	0,010±0,002	0,00	0,34±0,16
Этиловый спирт	96	1:2	20	0,54 ± 0,07	0,08±0,03	2,20±1,03	0,58±0,14
			10	0,13 ± 0,01	0,06±0,01	1,20±0,96	0,43±0,21
			0	0,17 ± 0,02	0,08±0,04	0,40±0,08	0,36±0,17
			-10	0,42 ± 0,02	0,05±0,03	0,30±0,04	0,31±0,25
			-20	0,34 ± 0,04	0,15±0,07	0,60±0,14	0,50±0,06
Этиловый спирт	96	1:3	20	0,62 ± 0,05	0,27±0,04	0,50±0,32	0,53±0,21
			10	0,23 ± 0,10	0,08±0,03	0,30±0,14	0,41±0,18
			0	0,29 ± 0,06	0,06±0,01	0,28±0,09	0,31±0,02
			-10	0,03 ± 0,01	0,09±0,06	0,13±0,07	0,51±0,23
			-20	0,05 ± 0,01	0,13±0,07	0,40±0,21	0,46±0,16
Изопропиловый спирт	99	1:1	20	0,22 ± 0,06	0,18±0,02	0,32±0,06	0,38±0,14
			10	0,24 ± 0,10	0,09±0,01	0,13±0,08	0,21±0,11
			0	0,29 ± 0,06	0,07±0,05	0,06±0,04	0,15±0,07
			-10	0,04 ± 0,02	0,10±0,07	0,28±0,12	0,11±0,08
			-20	0,05 ± 0,02	0,23±0,12	0,28±0,04	0,08±0,01
Изопропиловый спирт	99	1:2	30	7,10 ± 1,06	-	-	-
			20	10,80 ± 3,01	0,33±0,14	0,12±0,06	0,57±0,14
			10	3,40 ± 1,20	0,17±0,11	0,00	0,51±0,14
			0	0,54 ± 0,06	0,14±0,09	0,10±0,04	0,51±0,07
			-10	4,80 ± 0,91	0,21±0,04	0,20±0,05	0,38±0,12
			-20	10,68 ± 1,24	0,21±0,04	0,28±0,05	0,42±0,16
			-30	4,81 ± 1,65	-	-	-
Изопропиловый спирт	99	1:3	20	0,57 ± 0,09	0,39±0,12	1,60±1,03	0,28±0,12
			10	0,64 ± 0,20	0,08±0,03	0,80±0,32	0,23±0,07
			0	0,76 ± 0,34	0,24±0,15	0,00	0,35±0,12
			-10	0,43 ± 0,01	0,21±0,13	0,00	0,31±0,06
			-20	10,67 ± 3,45	0,33±0,24	0,00	0,45±0,09

Растворитель	Чистота растворителя, (%)	Модуль экстракции (образец:спирт)	Температура осаждения, С°	Выход, мг/мл			
				<i>Vischeria punctata</i>	<i>Chlorella zofingiensis</i>	<i>Euglena gracilis Klebs</i>	<i>Chlorella protothecoide s</i>
			-30	8,02 ±1,16	-	-	-
Бутиловый спирт	99	1:1	20	3,16 ±1,12	0,07 ±0,01	0,50±0,31	0,18±0,14
			10	0,64 ±0,09	0,07 ±0,01	0,30±0,09	0,19±0,09
			0	0,25 ±0,10	0,00	0,20±0,11	0,22±0,11
			-10	0,66 ±0,23	0,00	0,00	0,31±0,09
			-20	0,23 ±0,12	0,09 ±0,03	0,00	0,32±0,11
Бутиловый спирт	99	1:2	20	0,55 ±0,21	0,28 ±0,07	0,60±0,04	0,05±0,02
			10	1,07 ± 0,43	0,09 ±0,02	0,20±0,11	0,09±0,01
			0	0,55 ± 0,32	0,09 ±0,04	0,30±0,13	0,21±0,12
			-10	6,60 ±1,65	0,010 ±0,007	0,00	0,27±0,15
			-20	10,79 ± 4,56	0,00	0,00	0,35±0,03
			-30	7,00 ±1,59	-	-	-
Бутиловый спирт	99	1:3	30	5,54 ±2,13	-	-	-
			20	6,25 ±2,84	0,26 ±0,12	0,42±0,14	0,47±0,13
			10	1,20 ±0,76	0,10 ±0,05	0,31±0,09	0,13±0,11
			0	1,49 ±0,14	0,11 ±0,08	0,26±0,15	0,43±0,09
			-10	0,40 ±0,28	0,19 ± 0,06	0,00	0,17±0,04
			-20	1,53 ±0,17	0,23 ±0,12	0,00	0,36±0,13

По результатам исследования самый большой выход экзополисахаридов *Vischeria punctata* наблюдался при экстракции изопропиловым спиртом в соотношении 1:2 при температуре 20°C, для экзополисахаридов *Chlorella zofingiensis* с изопропиловым спиртом в соотношении 1:3 при температуре 20°C и для экзополисахаридов *Euglena gracilis Klebs* с этанолом в соотношении 1:2 при температуре 20°C., экзополисахариды *Chlorella protothecoide s* показали максимальный выход при взаимодействии с этиловым спиртом в соотношении 1:1, при температуре 20°C.

После подбора параметров экстракции мы планируем изучить биологическую активность полученных полисахаридов, так как по литературным данным известно, что экзополисахариды микроводоросли *Chlorella zofingiensis* оказывают очевидное ингибирующее действие против опухолевых клеток калоректального рака [5]. Парамилон *Euglena gracilis Klebs* обладает противоопухолевой активностью и антиоксидантной активностью [6,7]. Экзополисахариды (ЭПС), экстрагированные из *Chlorella Zofingiensis* и *Chlorella Vulgaris* оказывают значительное противоопухолевое действие на клетки НСТ8 [8]. ЭПС от *Parachlorella kessleri* (PCEPS) ингибировал рост рака толстой кишки у мышей путем прямого ингибирования роста клеток, а также путем стимуляции противоопухолевого иммунного ответа хозяина [9].

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, договор № 075-15-2022-245 (вн. № 13.2251.21.0134)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xiao R., Zheng Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications //Biotechnology Advances. – 2016. – Т. 34. – №. 7. – С. 1225-1244.

2. Elshobary M. E. et al. Antimicrobial and antioxidant characterization of bioactive components from *Chlorococcum minutum* //Food Bioscience. – 2020. – Т. 35. – С. 100567.
3. Gopinath V. et al. A review of natural polysaccharides for drug delivery applications: Special focus on cellulose, starch and glycogen //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2018. – Т. 107. – С.96-108.
4. Delattre C. et al. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides //Biotechnology advances. – 2016. – Т. 34. – №. 7. – С. 1159-1179.
5. Zhang J., Liu L., Chen F. Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity //International journal of biological macromolecules. – 2019. – Т. 134. – С. 976-983.
6. Quesada L. A. et al. Antitumor activity of paramylon on sarcoma-180 in mice //GANN Japanese Journal of Cancer Research. – 1976. – Т. 67. – №. 3. – С. 455-459.
7. Tolivia A. et al. Chemical constituents and biological activity of *Euglena gracilis* extracts //Journal of pharmacy research. – 2013. – Т. 7. – №. 3. – С. 209-214.
8. Borowitzka M. A. Microalgae in medicine and human health: A historical perspective //Microalgae in health and disease prevention. – Academic Press, 2018. – С. 195-210.
9. Zhang J., Liu L., Chen F. Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity //International journal of biological macromolecules. – 2019. – Т. 134. – С. 976-983.

MICROALGAE AS A POTENTIAL SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLYSACCHARIDES

¹Anokhova Veronika Dmitrievna, post-graduate student

²Budenkova Ekaterina Aleksandrovna, junior researcher

³Babich Olga Olegovna, doctor of technical sciences, researcher

^{1,2,3}Baltic Federal University named after I. Kant, Kaliningrad, Russia, e-mail: post@kantiana.ru

*In the research work, for the first time, the parameters of the alcohol extraction of *Chlorella zofingiensis*, *Vischeria punctata*, *Euglena gracilis* Klebs exopolysaccharides, which have biologically active properties, were selected using various extractants (ethanol, butanol and isopropyl alcohol), as well as with varying extraction temperature. Selected algae were grown in nutrient media recommended by IPPAS.*

УДК 664.951.3

НАПРАВЛЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЗАРУБЕЖНОЙ ПРАКТИКЕ

¹Баженов Елисей Александрович, аспирант

²Байдалинова Лариса Степановна, канд. техн. наук, профессор кафедры пищевой биотехнологии

^{1,2}ФГБОУ ВО «КГТУ», Калининград, Россия, e-mail: ¹ya.elisey2013@yandex.ru;

²1s.baydalina@gmail.com

Указывается роль ферментных препаратов, которые используются на биотехнологических производствах пищевых продуктов. Показана классификация пищевых ферментов, их специфичность действия на различных субстратах ферментных препаратов на основе микроорганизмов – продуцентов ферментов. Использование ферментов или микроорганизмов в приготовлении пищи –

это давний процесс. С развитием технологий были разработаны новые ферменты с широким спектром применения и специфичностью. Новые области применения все еще изучаются. Микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи и грибы, а также их ферменты широко используются в различных пищевых продуктах для улучшения вкуса и текстуры. Они приносят огромные экономические выгоды промышленным предприятиям. В настоящем обзоре обсуждаются последние достижения в области технологии ферментов для пищевой промышленности. Обсуждается полный перечень ферментов, используемых в пищевой промышленности, микробные и природные источники этих ферментов и широкий спектр их применения.

Введение

Из более чем 3000 идентифицированных ферментов только около 5% используются в промышленности [1,2]. Промышленное применение ферментов существенно снизило потребность в энергии во многих отраслях промышленности, а отходы, образующиеся в результате применения ферментов в промышленности, являются биоразлагаемыми и нетоксичными отходами, которые безвредны для окружающей среды. Кроме того, использование промышленных ферментов является более рентабельным, и может быть достигнута возможность генной инженерии микробов для получения более стабильных и улучшенных ферментов в промышленных масштабах [3-5]. Это привело к тому, что многие отрасли промышленности стали использовать ферменты вместо химических производственных технологий. Еще раз подтверждается необходимость производства ферментов в промышленных масштабах для различных промышленных применений. Недостатком использования ферментов в промышленности является то, что определенные производственные условия могут быть довольно суровыми для оптимальной работы ферментов. Производственные pH, давление, температура и присутствие потенциальных ингибиторов могут влиять на ферментативную активность ферментов [6] [7]. Например, большинство ферментов (из животных, растительных и микробных источников) оптимально работают при температуре около 37°C, нейтральном pH и в отсутствие ингибиторов. Кислотные и щелочные ферменты также могут быть выделены из отходов переработки рыбного и мясного сырья [3]. Ферменты, которые оптимально работают в жестких промышленных условиях, в настоящее время пользуются большим спросом, поскольку они нашли так много применений в пищевой промышленности, кормах для животных, молочных продуктах, напитках, сельском хозяйстве, производстве кожи, бумаги и целлюлозы, научных исследованиях и разработках, фармацевтике, текстиле, моющих средствах, отходах, биоочистке.

Рост спроса на промышленные ферменты в значительной степени объясняется растущим спросом на ферменты в качестве альтернативы как традиционным, так и синтетическим химическим веществам во многих промышленных процессах из-за экологически чистого характера применения ферментов в промышленности в отличие от использования химических веществ, которые генерируют так много парниковых газов. Использование ферментов в качестве альтернативы химическим веществам в промышленных процессах предотвращает выброс примерно 700 миллионов кг CO₂ в атмосферу в год [8]. Следовательно, рынок промышленных ферментов неуклонно рос в течение последних 6 десятилетий с чистой стоимости около 0,3 миллиарда долларов США в 1960 году до чистой стоимости в 6 миллиардов долларов США в 2020 году (рис. 1) [2] [8]. Кроме того, растущий спрос на ферменты во многих отраслях промышленности привел к росту числа компаний, производящих ферменты. В мировом производстве промышленных ферментов доминируют такие компании, как DSM, DuPont, Danisco OR, Novozymes, Advanced Enzyme Technologies, Ашапо Enzyme, Associated British Foods Plc. (ABF), Chr. Hansen Holding A/S, Enzyme Development Corporation (EDC), Aumgene Biosciences, Creative Enzymes, Adisseo, Megazyme, Enzyme Supplies Ltd., Enzyme Solutions, Biocatalysts Ltd., MetGen, Tex Biosciences, Sunson Industry Group.

Согласно недавнему отчету BlueWeave Consulting, рынок промышленных ферментов будет расти, и к 2027 году он будет оцениваться более чем в 9 миллиардов долларов США при совокупном годовом темпе роста в 6,8% [8].

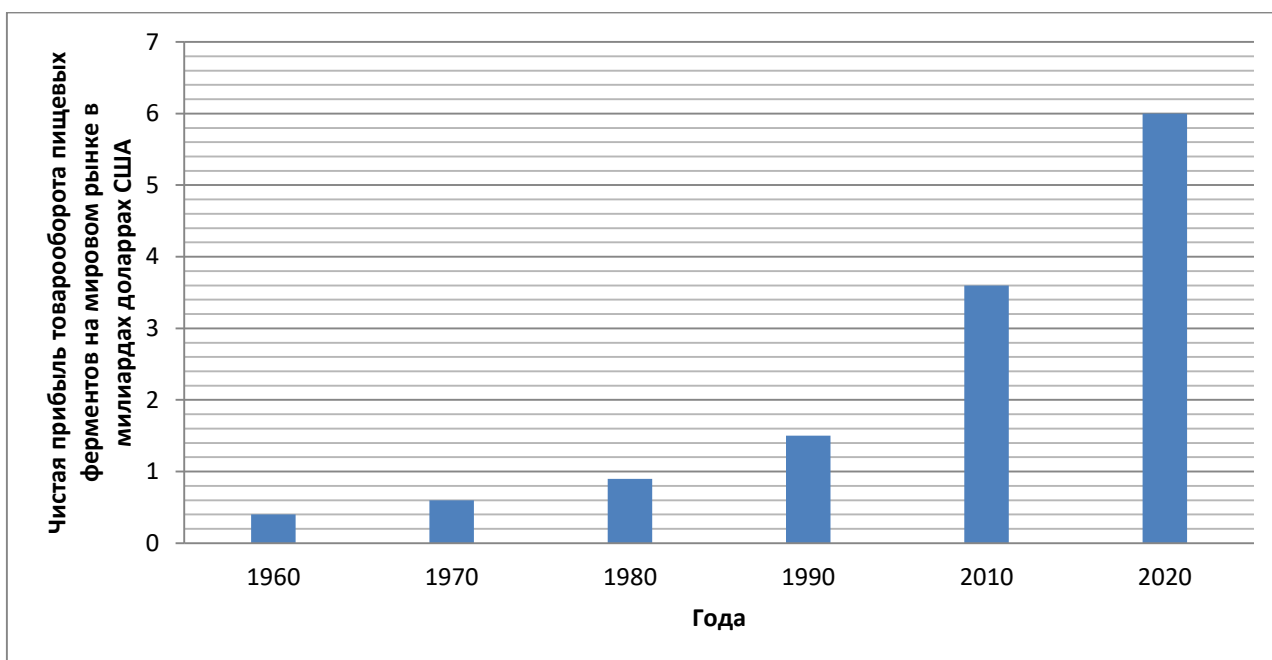


Рис 1. Графическое представление чистой стоимости рынка промышленных ферментов с 1960 по 2020 год. [3]

Среди многих отраслей промышленности, где ферменты нашли широкое применение, пищевая промышленность обеспечивает самый большой рынок сбыта ферментов: примерно 55% промышленных ферментов находят применение в пищевой промышленности [9]. Пищевая промышленность включает в себя производство выпечки, напитков, пивоварения, молочных продуктов, упаковки пищевых продуктов, фруктовых и овощных соков. По состоянию на 2020 год мировой рынок пищевых ферментов оценивался примерно в 2,3 миллиарда долларов США, что составляло примерно 40% стоимости всего рынка промышленных ферментов. А к 2026 году ожидается, что мировой рынок пищевых ферментов будет оцениваться более чем в 3,3 миллиарда долларов США [10]. При росте производства и широком использовании ферментов микробиологического синтеза в исследованиях и практическом применении развивается интерес к технологиям выделения ферментов из природного растительного и животного сырья. В качестве источников протеолитических ферментов перспективным считается ферментсодержащее вторичное рыбное сырье, в том числе пищеварительные органы рыб. Таким образом, можно предположить, что ферментные препараты, применяемые в пищевой промышленности, будут по-прежнему пользоваться спросом. В этой обзорной статье кратко описаны области применения некоторых важных микробных ферментов в пищевой промышленности и микробные источники этих ферментов.

Применение ферментов в пищевой промышленности

Ферментные препараты нашли многочисленные применения в различных отраслях пищевой промышленности, включая молочную, хлебопекарную, фруктовые и овощные соки, напитки и кондитерские изделия, корма для животных. Применение микробных ферментов в различных отраслях пищевой промышленности кратко представлено в табл. 1 и в следующих подразделах.

Протеазы - это ферменты, которые катализируют гидролитическое расщепление пептидных связей в белках с образованием более мелких полипептидов или аминокислот. Протеазы вырабатываются широким спектром живых организмов, включая растения, археи, грибы, бактерии и животных. Они нашли применение во многих отраслях пищевой промышленности, включая пивоваренную, молочную, хлебопекарную, пищевую, производство кормов для животных.

Протеазы играют важную роль в пивоваренной промышленности. Во время производства пива или виски в сусло добавляют протеазы для расщепления белков и высвобождения большего количества пептидов или аминокислот в сусло, что улучшает процесс брожения и общее качество пива или виски.

В молочной промышленности протеазы добавляют в молоко для гидролиза пептидной связи в каппа-казеине, тем самым дестабилизируя мицеллы казеина во время производства творога для производства сыра. Протеазы также улучшают органолептические и реологические характеристики сыра, а также снижают аллергенные свойства некоторых кисломолочных продуктов. Недавно в 2020 году продуцировали протеазу, свертывающую молоко, из штамма *Aspergillus oryzae* DRDFS13MN726447, и результаты показали, что протеаза из штамма *Aspergillus oryzae* улучшает общие органолептические свойства сыра [11].

В хлебопекарной промышленности протеазы добавляют в муку во время производства печенья (крекеров), чтобы ослабить структуру белка клейковины в муке, в противном случае тесто будет трудно обрабатывать. Использование протеазы для ослабления клейковины не влияет на другие питательные компоненты теста, в отличие от случаев, когда для достижения той же цели используется химическое соединение, такое как бисульфит натрия. Следовательно, повышается питательная ценность печенья (крекеров). Кислотная протеаза из *Aspergillus usami* улучшает реологические свойства пшеничной клейковины, используемой для выпечки [12].

Протеазы используются в пищевой промышленности для улучшения питательных и функциональных свойств пищевых материалов, богатых белками. Например, на мясоперерабатывающих предприятиях протеазы используются для усиления размягчения мяса, тем самым улучшая реологические свойства мяса.

Протеазы могут быть добавлены в корм для животных, чтобы расщепить содержащиеся белки в корме на аминокислоты, для повышения биодоступности питательных веществ в корме.

Протеазы могут быть получены из растений, животных и микробов, но грибы и бактерии являются лучшими источниками для производства протеаз для применения в пищевой промышленности. Грибковые источники протеаз, используемых в пищевой промышленности, включают *Aspergillus usami* [12], *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* [13], *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus oryzae* DRDFS13MN726447 [11]. Бактериальные протеазы, используемые в пищевой промышленности, продуцируются *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 [11], *Bacillus licheniformis*, *Chryseobacterium* sp. [14].

Таблица 1

Характеристика ферментных препаратов (ФП) для пищевой промышленности [12]

Основной фермент в ферментном комплексе	Продуценты	Оптimum действия ФП		Способ воздействия на субстрат и задачи применения ФП	Область применения и эффективность
		t °C	pH		
биоконверсия крахмала (α -амилаза, глюкоамилаза, пуллуланаза)					
Бактериальная α -амилаза	<i>Bacillus subtilis</i>	60-70	5,5-7,0	Для разжижения и декстринизации крахмала	В спиртовом, крахмалопаточном, пивоваренном, хлебопекарном производствах для снижения вязкости зерновых замесов, увеличения выхода и качества цельного продукта
Термостабильная α -амилаза	<i>Bacillus licheniformis</i>	85-95	6,0-7,0	То же	
	<i>B. stearothermophilus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	70-90 60-97	5,0-6,0 5,0-6,5		
Грибная α -амилаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	50-55	4,5-5,5	Для гидролиза крахмала до декстринов, олигосахаридов и мальтозы	
Глюкоамилаза Пуллуланаза	<i>Aspergillus awamori</i>	55-60	4,3-5,0	Для осахаривания частично расщепленного крахмала до глюкозы Для гидролиза α -1,6-связей в амилопектине и предельных декстринах до мальтоолигосахаридов	В производстве спирта, пива, кристаллической глюкозы, глюкозо-фруктозных сиропов для интенсификации процессов и увеличения выхода готовой продукции
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aerobacter aerogenes</i>	55-65	4,1-4,5		
	<i>Bacillus pullulans</i>	58-65	4,0-6,0		
биоконверсия белков (протеазы, трансклутаминаза)					
Бактериальные протеазы (протеаза Б)	<i>Bacillus subtilis</i>	50-60	6,5-10,0	Для гидролиза белков до пептидов с различной молекулярной массой	В производстве спирта, вина,

Основной фермент в ферментном комплексе	Продуценты	Оптimum действия ФП		Способ воздействия на субстрат и задачи применения ФП	Область применения и эффективность
		t °C	pH		
Грибные протеазы (протеазы ГК)	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	50-55	4,7-5,3	Для протеолиза белков до низкомолекулярных пептидов и аминокислот	пива, белково-аминокислотных ингредиентов, биологически активных добавок
Трансглутаминаза	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	30-60	4,0-7,5	Для изменения структуры и функциональных свойств белков путем образования межмолекулярных связей между белками	хлебобулочных изделий. Переработка микробной биомассы, растительных, микробных и животных белков. Переработка молочной продукции. В производстве мясной и рыбной продукции
биоконверсия полисахаридов (пектиназы, ксиланазы, целлюлазы, β -глюканазы)					
β -Глюканаза, ксиланаза, целлюлаза	<i>Trichoderma viride</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i> и др.	50-65	5,0-7,0	Для гидролиза некрахмальных полисахаридов	В производстве спирта, пива, крахмала, кормов для снижения вязкости и повышения биодоступности субстрата, увеличения выхода готовой продукции
Пектиназа Пектинэстераза Полигалактуроназа	<i>Aspergillus foetidus</i>	40-50	3,5-5,5	Для гидролиза пектиновых веществ плодово-ягодного и растительного сырья	В консервном, соковом, винодельческом и ликеро-водочном производствах для снижения вязкости и повышения биодоступности субстрата, увеличения выхода и качества целевой продукции

Целлюлазы представляют собой группу ферментов, которые катализируют целлюлололиз. Они гидролизуют β -1,4-гликозидные связи в полимерной целлюлозе, гемицеллюлозе, лишенине и глюканах с образованием мономеров глюкозы. В зависимости от того, на какую часть целлюлозы воздействует целлюлаза, целлюлазы могут быть классифицированы как эндо-(1,4)- β -d-глюканаза, экзо-(1,4)- β -d-глюканаза или β -глюкозидазы [15].

Целлюлазы нашли некоторое применение в производстве фруктовых и овощных соков. Во время производства фруктовых и овощных соков плавающая целлюлоза и гемицеллюлоза из фруктов и овощей имеют тенденцию образовывать некоторое помутнение во фруктовом и овощном соке. Это негативно сказывается на качестве фруктовых и овощных соков, делая их менее привлекательными. Следовательно, целлюлазы используются в производстве фруктовых соков в качестве ферментов, размягчающих фрукты, для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы в сырых фруктовых и овощных соках, тем самым улучшая экстракцию сока, осветление, стабилизацию и общий выход [16].

Во время обработки фруктовых и/или овощных пюре целлюлазы используются для увеличения выхода пюре, для сведения к минимуму повреждений, вызванных нагреванием, а также для снижения вязкости пюре. Персик, манго, груша, слива, гуава и папайя - вот некоторые из фруктов, чьи пюре были обработаны целлюлазой во время их переработки.

Корм для жвачных животных обычно богат сложными полисахаридами, такими как целлюлоза, пектин, лигнин и гемицеллюлоза, которые должны быть переварены животным. Чтобы улучшить усвояемость этих кормов для животных, целлюлазы используются при переработке жевательных кормов, поскольку они могут расщеплять целлюлозу и гемицеллюлозу в корме для животных до более усвояемой формы.

Хотя целлюлаза может вырабатываться несколькими многоклеточными организмами, такими как улитки, термиты и дождевые черви, однако бактерии и грибы остаются лучшими источниками для производства целлюлаз для промышленного применения. Целлюлазы для применения в пищевой промышленности могут быть получены из таких грибов, как *Aspergillus niger* и *Trichoderma reesei* [16]. Источники бактерий для производства промышленных целлюлаз включают *Paenibacillus* spp., Вид *Bacillus* (ABDR01) [17], вид *Bacillus licheniformis* [18] и *Streptomyces* sp. Штамм J2 [19].

Пектиназы - это группа ферментов, которые катализируют различные реакции в пектиновых веществах, содержащихся в клеточных стенках растений. Эти реакции включают гидролиз α -1,4-гликозидных связей, катализируемый полигалактуроназой, транселиминативное расщепление метилового эфира α -1,4-D-галактуронана, катализируемое пектолиазой, и деацетилирование и деметоксилирование пектина пектиноэстеразой [20].

Пектиназы используются в производстве фруктовых соков для разложения пектина (депектинизации) в клеточной стенке фруктов, тем самым улучшая экстракцию сока, вкус, осветление, фильтруемость и общий выход фруктового сока. [20] [21] [22].

В производстве напитков пектиназы можно использовать на стадии отверждения при влажной обработке для производства кофе, поскольку это улучшает выход, аромат и вкус кофе, а также сокращает время обработки. Пектиназы также могут быть использованы на предприятиях по переработке какао для обеспечения полного удаления слизистых слоев какао-бобов, тем самым улучшая качество производимого какао [23]. При производстве чая обработка чайных листьев пектиназами снижает содержание пектина в листьях, тем самым обеспечивая относительно более быстрый процесс ферментации [24].

Пектиназы используются в комбикормовой промышленности для обработки кормов, богатых пектином, и улучшения их усвояемости животными.

Для переработки и отчистки не рафинированных масел, используют пектиназы (и некоторые другие ферменты, которые разлагают целлюлозу и гемицеллюлозу) для повышения выхода рафинированного растительного масла.

Пектиназы распространены повсеместно, но производство пектиназ для промышленного применения в основном достигается за счет использования микробов. Пектиназы в основном продуцируются грибами, включая *Aspergillus niger* MTCC [22], *Penicillium* spp., *Moniliella* SB9, *Streptomyces* spp. [19], *Aspergillus* spp. Гм, *Fusarium* spp. С, *Aspergillus* spp. Т и *Penicillium* spp. Lco [20]. *Aspergillus kawachii* [24], *Aspergillus fumigatus* [24]. Штамм *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* ABDR01) также может давать высокие выходы пектиназы [17].

Липаза - это фермент, который катализирует гидролитическое расщепление жиров/триглицеридов на составляющие их жирные кислоты и глицерин. Липазы также участвуют в биосинтезе длинноцепочечных ацилглицеридов. В идеале все животные, включая человека, могут вырабатывать липазу типа А в своем желудке и поджелудочной железе, чтобы помочь перевариванию жиров. Липазы также вырабатываются в листьях, стеблях, латексе и семенах многих растений. Однако производство липазы в промышленных масштабах достигается за счет бактериальных и грибковых источников. Применение липазы охватывает широкий спектр отраслей промышленности, включая пищевую, моющую, кожевенную, текстильную, бумажную и целлюлозно-бумажную промышленность.

При производстве сыра липаза используется для гидролиза молочного жира в свободные жирные кислоты, что придает сыру неповторимый аромат, улучшает его вкус, способствует созреванию сыра и улучшает его текстуру [25].

Липаза используется в компаниях по производству вина и напитков для улучшения аромата вина и напитка соответственно.

Липаза может быть использована для катализа гидролиза липидов, содержащихся в яичном белке, тем самым улучшая качество выпеченного продукта. Липаза также может служить консервантом в некоторых хлебобулочных изделиях [26].

Липазы могут быть использованы в качестве дегуммирующих агентов для удаления фосфатидов из сырого соевого, рапсового и подсолнечного масла в процессе рафинирования сырого растительного масла. Дегуммирование сырого растительного масла - это процесс, который повышает выход и качество рафинированного растительного масла. Липазу также можно использовать для обработки сырого растительного масла с получением вкусовых эфиров, которые улучшают органо-

лептические свойства рафинированного масла. Конг и др., [27] (2019) произвели новую липазу под названием An-липаза из уникального черного штамма *Aspergillus F0125*, которую они использовали для этерификации сырого соевого масла с получением ароматических эфиров этиллактата, бутилбутирата и этил-каприлата. Содержание ω -3 полиненасыщенных жирных кислот в лососевом жире может быть увеличено при обработке некоторых масел, таких как масло сардин и лососевое масло липазой.

Источники бактерий для производства липазы включают вид *Bacillus subtilis* LP2, *Pseudomonas aeruginosa* JCM5962(T), *Staphylococcus* goat NCU S6.

Заключение

Ожидается, что в связи с непрерывным ростом численности населения планеты спрос на продукты пищевой промышленности будет продолжать расти. Следовательно, ожидается, что спрос на ферменты для применения в пищевой промышленности и стоимость мирового рынка пищевых ферментов сохранят тенденцию к росту, как и прогнозировалось. Поэтому необходимо активизировать исследования, направленные на производство новых ферментов для применения в пищевой промышленности, чтобы удовлетворить спрос на промышленные ферменты. С помощью достижений пищевой биотехнологии и биоинженерии источники ферментов могут быть модифицированы для перепроизводства ферментов с желаемыми биохимическими характеристиками и более высокой ферментативной активностью. Кроме того, можно стимулировать выработку химерных ферментов посредством генетической комбинации генов ферментов из разных микробов. Благодаря этому фермент слияния может быть использован в нескольких процессах промышленного производства, что позволяет экономить затраты, время и расходные материалы для производства нескольких ферментов с различными функциями. Развиваются исследования по технологиям выделения ферментов из вторичного рыбного сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Worthington, C.C., Worthington, V. and Worthington, A. (2019) Introduction to Enzymes.
2. Robinson, P.K. (2015) Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41.
3. Patel, A.K., Singhania, R.R. and Pandey, A. (2017) Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In: Brahmachari, G., Ed., *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Academic Press, Cambridge, MA, 13-41.
4. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) (2021) Enzyme Nomenclature.
5. Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V. (2013) A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 2013, Article ID: 329121.
6. Singh, S. and Bajaj, B.K. (2016) Bioprocess Optimization for Production of Thermoalkali-Stable Protease from *Bacillus subtilis* K-1 under Solid-State Fermentation. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46, 717-724.
7. Littlechild, J.A. (2015) Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, Article 161.
8. BlueWeave Consulting and Research Pvt. & Ltd. (2021) Global Industrial Enzymes Market Projected to Reach Worth \$9.2 bn by 2027. Focus on Catalysts, 2021, 2.
9. Guerrand, D. (2017) Lipases Industrial Applications: Focus on Food and Agroindustries. *OCL-Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 24, Article No. D403.
10. Research and Markets (2021) Food Enzymes Market, Global Forecast, Impact of COVID-19, Industry Trends, by Types, Growth, Opportunity Company Analysis.
11. Mamo, J., Getachew P., Kuria, M.S. and Assefa, F. (2020) Application of Milk-Clotting Protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo Cheese Production. *Journal of Food Quality*, 2020, Article ID: 8869010.
12. Deng, L., et al. (2016) Improvement of Functional Properties of Wheat Gluten Using Acid Protease from *Aspergillus usamii*. *PLoS ONE*, 11, e0160101.

13. Okpara, M.O., Bamidele, O.S. and Ajele, J.O. (2019) Enhanced Production of Salinity-Induced Proteases from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Advances in Enzyme Research*, 7, 45-56.
14. Mageswari, A., Subramanian, P., Chandrasekaran, S., Karthikeyan, S. and Gothandam, K.M. (2017) Systematic Functional Analysis and Application of a Cold-Active Serine Protease from a Novel *Chryseobacterium* sp. *Food Chemistry*, 217, 18-27.
15. Pandey, P., Kuila, A. and Tuli, D.K. (2021) Cellulase: An Overview. In: Tuli, D.K. and Kuila, A., Eds., *Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases*, Elsevier, Amsterdam, 95-113.
16. Bhat, M.K. (2000) Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355-383.
17. Yadav, A., Mahaboob Ali, A.A., Ingawale, M., Raychaudhuri, S., Gantayet, L.M. and Pandit, A. (2020) Enhanced Co-Production of Pectinase, Cellulase and Xylanase Enzymes from *Bacillus subtilis* ABDR01 upon Ultrasonic Irradiation. *Process Biochemistry*, 92, 197-201.
18. Manzum, A.A. and Al Mamun, A. (2018) Isolation of *Bacillus* spp. Bacteria from Soil for Production of Cellulase Abstract Introduction: Screening and Isolation of *Bacillus* spp. *Nepal Journal of Biotechnology*, 6, 57-61.
19. Jaradat, Z., Dawagreh, A., Ababneh, Q. and Saadoun, I. (2008) Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* sp. (Strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 1, 141-146.
20. Sudeep, K.C., et al. (2020) Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. *Fermentation*, 6, Article 59.
21. Tapre, A.R. and Jain, R.K. (2014) Pectinases: Enzymes for Fruit Processing Industry. *International Food Research Journal*, 21, 447-453.
22. Anand, G., Yadav, S. and Yadav, D. (2017) Production, Purification and Biochemical Characterization of an Exo-Polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 Suitable for Clarification of Orange Juice. *3 Biotech*, 7, Article No. 122.
23. Oumer, O.J. (2017) Pectinase: Substrate, Production and Their Biotechnological Applications. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2, 1007-1014.
24. Suhaimi, H., et al. (2021) Fungal Pectinases: Production and Applications in Food Industries. In: Dai, X., Sharma, M. and Chen, J., Eds., *Fungi in Sustainable Food Production*, Springer Nature Switzerland, Cham, 85-116.
25. Гаскарова Е.Ф. Дрожжи *Candida parapsilosis* МЮ - новый продуцент липазы / Е.Ф. Гаскарова, Л.А. Иванова // Сборник 7-го Международного научно-практического симпозиума «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов» - 2014. - с.44-47.
26. Гаскарова Е.Ф. Оценка специфичности действия ферментного препарата липаза М10-10 Г20х / Е.Ф. Гаскарова, Л.А. Иванова, С.С. Строева, Н.В. Фадякина // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» - М.: ЗАО «Экспобиохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015. - с. 415 - 417.
27. Cong, S., et al. (2019) Synthesis of Flavor Esters by a Novel Lipase from *Aspergillus niger* in a Soybean-Solvent System. *3 Biotech*, 9, Article No. 244.

DIRECTIONS OF PRODUCTION AND USE OF FOOD ENZYME PREPARATIONS IN FOREIGN PRACTICE

¹Bazhenov Yelisey Alexandrovich, Postgraduate student

²Baydalina Larisa Stepanovna, Candidate of Technical Sciences, Professor of the Department of Food Biotechnology

^{1,2}Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia, e-mail: ¹ya.elisey2013@yandex.ru; ²ls.baydalina@gmail.com

This article indicates the role of enzyme preparations that are used in biotechnological food production. The classification of food enzymes, their specificity of action on various substrates of enzyme preparations based on microorganisms – producers of enzymes is shown. The use of enzymes or microorganisms

in cooking is a long-standing process. With the development of technology, new enzymes have been developed with a wide range of applications and specificity, and new applications are still being studied. Microorganisms such as bacteria, yeast and fungi, as well as their enzymes, are widely used in various food products to improve taste and texture, and they bring huge economic benefits to industrial enterprises. This review discusses the latest advances in enzyme technology for the food industry. The full list of enzymes used in the food industry, microbial and natural sources of these enzymes and a wide range of their applications are discussed.

УДК 665.52/.54

РАЗРАБОТКА АКТИВНЫХ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ УПАКОВОЧНЫХ ПЛЕНОК С ЭФИРНЫМИ МАСЛАМИ

¹Борисова Анна Викторовна, канд. техн. наук, доцент,
доцент Высшей биотехнологической школы

²Шабанова Полина Васильевна, магистрант Высшей биотехнологической школы

^{1,2}ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет»,
Самара, Россия, e-mail: ¹anna_borisova_63@mail.ru; ²shabanovapv@mail.ru

Активная упаковка является одним из перспективных способов сохранения пищевых продуктов. Включение в состав упаковочных материалов противомикробных препаратов препятствует росту микроорганизмов и продлевает срок годности продукта. Целью работы была разработка активной биоразлагаемой упаковочной пленки с включением в нее эфирных масел. Были разработаны активные пленки из полилактоида с эфирными маслами розмарина, мелиссы, шалфея, обладающими антиоксидантными свойствами. Определены физико-химические свойства пленок, включая паропроницаемость, степень набухания, растворения. Показано, что пленки имеют потенциал для разработки активной упаковки для пищевых продуктов.

Активная упаковка является одним из перспективных способов сохранения пищевых продуктов. Включение в состав упаковочных материалов противомикробных препаратов препятствует росту микроорганизмов и продлевает срок годности продукта. Противомикробные свойства упаковки обеспечиваются двумя способами: путем выделения из упаковочного материала и миграции в продукт вещества-консерванта [1] или путем включения в упаковочный материал вещества, обладающего противомикробным действием при его контакте с целевым микроорганизмом [2]. В настоящее время предлагаются различные упаковочные материалы с противомикробным действием [3, 4]. Примером использования подобных упаковочных технологий может служить система Microban британской фирмы Microban Products Co., где для предотвращения роста микроорганизмов применяется включение в состав практически любой упаковочной пленки триклозана (вещества с противомикробным действием) так, что он может мигрировать из упаковочного материала на поверхность продукта [5]. Для использования в полимерных и съедобных пленках предложены и другие синтетические и натуральные консерванты [6, 7, 8, 9] – соли органических кислот (пропионаты, бензоаты, сорбаты), а также бактерициды (например, низин), экстракты специй и пряностей (розмарина, чеснока, хрена, горчицы, корицы и тимьяна), ферменты (пероксидаза, лизоцим и глюкозооксидаза), хелирующие агенты (например, ЭДТК, этилендиаминтетрауксусная кислота), соли неорганических кислот (диоксиды серы и хлора), противогрибковые вещества (в частности, имазалил и беномил). Наиболее перспективными областями применения являются упаковка мяса, рыбы, хлеба, сыра, овощей и фруктов [7].

Эфирные масла являются важнейшими противомикробными агентами, используемыми человеком с древности. Эфирные масла (ЭО) – это ароматические, маслянистые, летучие окрашенные

жидкости, полученные из частей растений (цветов, почек, семян, листьев, веток, коры, трав, древесины, плодов и корней). Многие ЭО обладают антиоксидантными свойствами, которые помогают уничтожать свободные радикалы, в том числе оксид азота (NO), синглетный кислород (O₂), супероксид (O₂⁻), гидроксильный ион (OH⁻) и перекись водорода (H₂O₂). *Rosmarinus officinalis* имеет несколько применений, особенно в пищевой промышленности и консервирующая промышленность из-за его естественного антиоксидантного и противомикробного действия. Сообщается, что α-пинен является основным компонентом эфирного масла розмарина, за которым следуют 1,8-цинеол, камфен, β-мирцен, камфора и борнеол. Было определено, что эфирное масло розмарина проявляет антимикробную активность, проходя через клеточную стенку и мембраны цитоплазмы и разрушая их структуру как типичное липофильное вещество [10].

Применение в упаковке пластиков из углеводородного сырья приводит к значительному росту экологических проблем, что повышает интерес к биоразлагаемым полимерам (биополимерам) из возобновляемых источников, обладающих возможностью разложения микроорганизмами путем химического, физического или биологического воздействия [11]. Полимолочная кислота (PLA) является частью семейства алифатических полиэфиров, обычно получаемых из α-гидроксикислот, состоит из полигликолевой кислоты или полиманделовой кислоты. Полимолочная кислота (PLA) является хорошо известным биоразлагаемым биопластиком, получаемым в результате ферментации биомассы, такой как картофель, кукуруза и сахар, и является хорошим кандидатом на замену синтетических пластмасс на основе нефти в условиях растущего глобального спроса на сельскохозяйственные и экологически устойчивые биопродукты. PLA является популярным материалом для медицинской хирургии и тканевой инженерии, автомобильных компонентов, упаковки пищевых продуктов, разлагаемых пластиковых пакетов в супермаркетах [12, 13].

Объекты и методы исследований

Объектами исследования являлись противомикробные добавки – эфирные масла розмарина (*Rosmarinus officinalis*), Германия, Melissa (*Melissa officinalis*), Китай, шалфея (*Salvia sclarea*), Германия. Гранулы полилактида PLA были получены от Bestfilament, Россия. В качестве пластификатора использовали полисорбат: ТВИН-80 марки A&T Cosmetics.

Получение активной пленки

1) Гранулы PLA диспергировали в растворе хлороформа при температуре 35 °С, при постоянном перемешивании в течение 4 часов. После полного растворения гранул PLA, добавляли эфирное масло до конечной концентрации 3%, 5%, 7%, 9% (г/100 мл пленочного раствора).

2) Гранулы PLA диспергировали в растворе хлороформа при температуре 35 °С, при постоянном перемешивании в течение 4 часов. После полного растворения гранул PLA добавляли пластификатор и раствор перемешивали 1 ч. Затем в полимерный раствор добавляли эфирное масло до конечной концентрации 3%, 5%, 7%, 9% (г/100 мл пленочного раствора).

Для получения пленок использовали метод литья. Пленкообразующие растворы (25 г) заливали в чашки Петри диаметром 10 см и сушили при температуре 25±1 °С и относительной влажности 60±2% в течение 24 часов. Затем высушенные пленки осторожно отделяли от чашки и выдерживали 24 ч в эксикаторах, содержащий порошок безводного хлористого кальция (CaCl₂), при температуре 25 °С перед дальнейшими исследованиями.

Для исследования пленки были изучены: определение толщины, определение влажности, определение паропроницаемости, определение непрозрачности, определение высвобождения антиоксидантных объектов.

Извлечение экстрактивных веществ из эфирных масел осуществлялось 95% этанолом при температуре 37 °С.

Для эфирных масел были изучены: содержание фенольных соединений, общее содержание флавоноидов, антиоксидантная активность по методу DPPH, восстанавливающая сила по методу FRAP.

Результаты и их обсуждение

Общее содержание фенольных веществ, флавоноидов, антиоксидантная и антирадикальная активность эфирных масел приведены в табл. 1.

Таблица 1

Химический состав и антиоксидантные свойства эфирных масел

Эфирное масло	Фенольные вещества, мг галловой кислоты/100 г сырья	Флавоноиды, мг катехина / 100 г сырья	Восстанавливающая сила FRAP, ммоль Fe ²⁺ / 1 кг сырья	Антирадикальная активность по методу DPPH, E _{CSO} , мг/мл
Розмарин	29,05	17,92	1,15	-
Мелисса	165,3	143,40	0,91	1,0
Шалфей	43,60	90,86	0,89	204,0

Содержание фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в 100 г исходного сырья преобладает в эфирном масле мелиссы – 165,5 мг галловой кислоты/ 100 г исходного сырья. Наименьшее количество обнаружено в эфирных маслах шалфея (43,6 мг галловой кислоты/100 г исходного сырья) и розмарина (29,05 мг галловой кислоты/100 г исходного сырья). Фенольные вещества – это вторичные метаболиты растений, выполняющие весьма важные функции для их жизнедеятельности. Уникальное химическое строение, присущее классу фенольных веществ (в частности, большое количество гидроксильных групп), обуславливает их высокую антирадикальную, антиоксидантную активность.

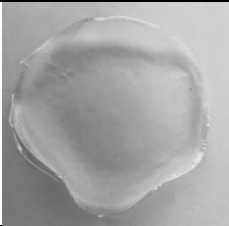
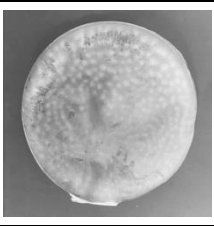

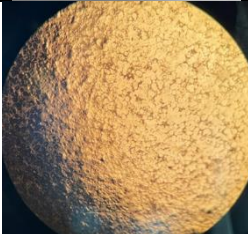
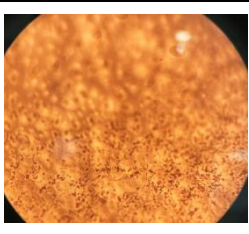
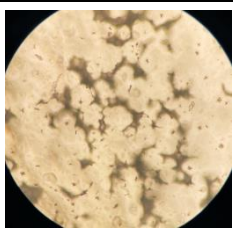




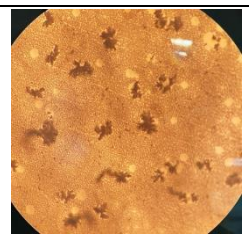

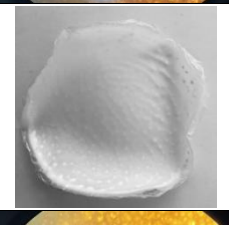
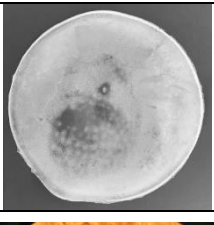

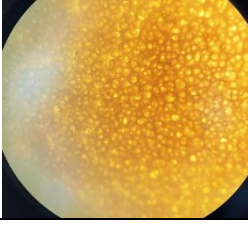
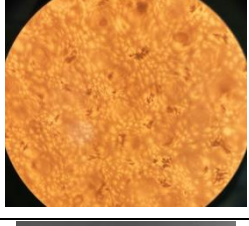

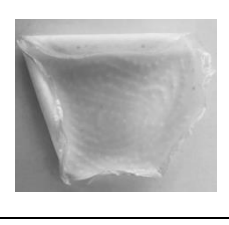


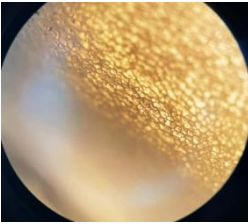

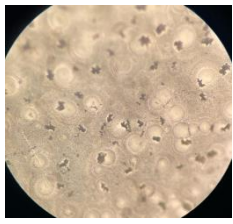
Флавоноиды, относящиеся к классу фенольных веществ, также известны как основные антиоксиданты. По результатам исследований на количество флавоноидов, следует, что максимальное содержание флавоноидов у эфирного масла мелиссы (143,4 мг катехина / 100 г сырья).


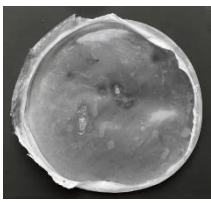

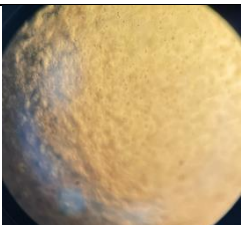



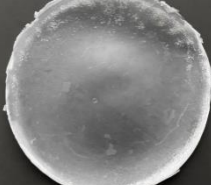

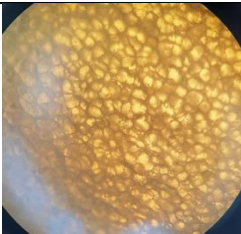
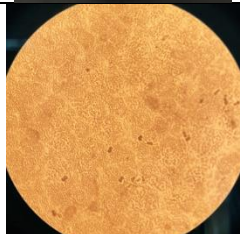


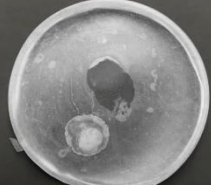
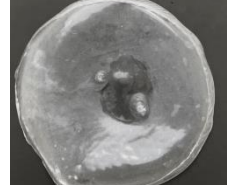
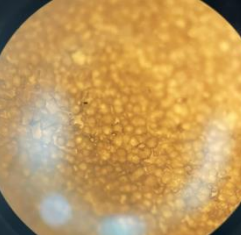

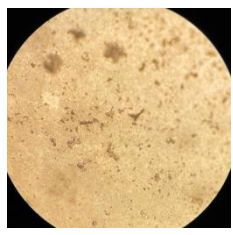



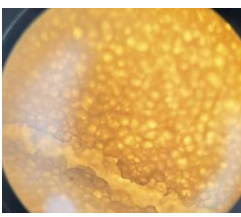
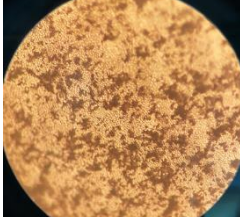
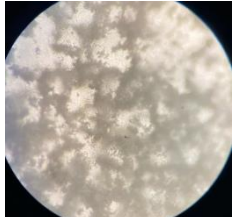
Антиоксидантные свойства мы изучали по двум методам. Метод определения восстанавливающей силы по методу FRAP – основан на способности экстрактов орехов восстанавливать металлы переменной валентности, которые являются одним из главных катализаторов реакции окисления. Восстанавливающая сила для экстрактов эфирных масел находится примерно на одном уровне и не сильно высока. Максимальное значение восстанавливающей силы выявлено у эфирного масла розмарина (1,15 Fe²⁺ / 1 кг сырья).

Антиоксидантная активность растительных экстрактов интересует исследователей с точки зрения предотвращения и приостановления свободнорадикального механизма окисления. В последнее время уже установлено наличие различных механизмов действия антиоксидантов. Одним из самых распространенных методов определения антиоксидантной активности является метод со стабильным радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH). В данной работе применялся метод определения концентрации экстракта, при которой связывается 50% свободного радикала. Наилучшая активность по показателю антиоксидантной активности обнаружена у эфирного масла мелиссы (1,0 мг/мл). Антирадикальную активность не удалось определить у эфирного масла розмарина.

Содержание фенольных веществ и флавоноидов в эфирных маслах связано со многими факторами: их сортом, местом и временем сбора урожая, условиями хранения и обработки.

Внешний вид активных пленок

Концентрация эфирного масла в пленке		Розмарин	Мелисса	Шалфей
3%	Внешний вид			
	Увеличение 1000			
5%	Внешний вид			
	Увеличение 1000			
7%	Внешний вид			
	Увеличение 1000			
9%	Внешний вид			
	Увеличение 1000			

Концентрация эфирного масла в пленке		Розмарин	Мелисса	Шалфей
3 %, Твин-80	Внешний вид			
	Увеличение 1000			
5 %, Твин-80	Внешний вид			
	Увеличение 1000			
7 %, Твин-80	Внешний вид			
	Увеличение 1000			
9 %, Твин-80	Внешний вид			
	Увеличение 1000			

В табл. 2 представлен внешний вид и микроскопирование пленок в зависимости от вида масла, его концентрации и добавления пластификатора. Можно сделать вывод, что добавление пластификатора к образцам пленки с добавлением эфирного масла розмарина, влияет на пластичность, делая образцы жесткими, с изменением формы (скручивание), что в будущем представляет сложность для формования упаковок. Добавление эфирного масла розмарина, мелиссы придает образцам непрозрачность вне зависимости от концентрации масла. Критическое изменение прозрачности у образцов пленок с добавлением шалфея начинается с 5 %-ой концентрации масел. Добавление пластификатора снижает жесткость у образцов с добавлением эфирных масел мелиссы и шалфея.

По результатам анализа микроскопирования пленок, можно ответить, что пленки с добавлением эфирного масла розмарина разной концентрации, мелиссы с концентрацией 3 %, шалфея разной концентрации, показывает отсутствие значительных пустот и уплотнений, что свидетельствует о формировании упругоэластичной системы. В пленках с добавлением эфирного масла мелиссы концентрации 5 %, 7 %, 9 % наблюдаются образования кристаллических сгустков, что свидетельствует о хрупкости системы. На поверхности пленок с добавлением пластификатора показывает отсутствие значительных пустот и уплотнений в концентрациях 3 %, 5 %, 7 % эфирного масла розмарина, а также масла мелиссы концентрацией 3 %, 5 %, 9 %, масла шалфея концентрацией 3 %, что свидетельствует о формировании упругоэластичной системы. В пленке с концентрацией 9 % эфирного масла розмарина, наблюдаются пустоты и трещина, что связано с закручиванием пленок в спираль и повышения вязкости исходного раствора перед литьем. В пленке с 7 % маслом мелиссы наблюдаются пустоты и кристаллы, в пленках 5 %, 7 %, 9 % масла шалфея наблюдаются кристаллы, что свидетельствует о хрупкости системы.

В таблице 3. представлены физические и физико-химические параметры пленок

Таблица 3

Физико-химические свойства активных пленок

Материал	Толщина, мкм	Влагосодержание, %	Непрозрачность пленок, $A_{600}/\text{мм}$	Паропроницаемость, $\cdot 10^{-11} \text{ г/м}^2\text{с}^{-1}\text{Па}^{-1}$	Степень набухания	Растворимость в воде, %
Контроль	200,0±6,1	11,94±0,53	0,24±0,01	34,00±1,90		0,85±0,05
Розмарин, 3%	230,0±6,9	13,18±0,59	1,88±0,11	2,70±0,15		1,57±0,09
Розмарин, 5%	330,0±9,5	16,80±0,77	4,61±0,25	5,10±0,28		11,29±0,63
Розмарин, 7%	250,0±7,5	25,16±1,10	5,52±0,31	4,60±0,25		8,68±0,48
Розмарин, 9%	300,0±8,7	19,86±0,91	2,69±0,13	2,40±0,12		6,11±0,29
Мелисса, 3%	150,0±4,5	22,34±1,04	9,71±0,48	3,60±0,16		9,26±0,54
Мелисса, 5%	250,0±7,2	31,93±1,43	4,27±0,21	6,20±0,31		9,95±0,55
Мелисса, 7%	300,0±8,9	52,42±2,56	3,00±0,17	7,20±0,36		12,54±0,68
Мелисса, 9%	450,0±13,0	56,21±2,69	2,14±0,09	1,30±0,07		25,72±1,44
Шалфей, 3%	25,0±0,5	55,11±1,10	0,72±0,04	1,40±0,08		17,47±0,87
Шалфей, 5%	20,0±0,4	61,52±2,76	0,65±0,03	3,10±0,15		24,20±1,33
Шалфей, 7%	280,0±7,0	70,00±3,15	4,92±0,27	4,00±0,22		26,79±1,50
Шалфей, 9%	250,0±6,7	70,88±3,26	4,55±0,25	3,70±0,21		27,03±1,48
Контроль, твин-80	900,0±27,0	13,80±0,59	1,15±0,06	5,60±0,30		0,82±0,04
Розмарин, 3%, твин-80	500,0±15,0	13,74±0,61	1,51±0,08	6,20±0,31		1,98±0,11

Материал	Толщина, мкм	Влагосодержание, %	Непрозрачность пленок, $A_{600}/\text{мм}$	Паропроницаемость, $\cdot 10^{-11} \text{ г/м}^2 \cdot \text{с}^{-1} \text{ Па}^{-1}$	Степень набухания	Растворимость в воде, %
Розмарин, 5%, твин-80	800,0±22,4	13,81±0,62	1,61±0,09	4,10±0,23		2,97±0,16
Розмарин, 7%, твин-80	1000,0±29,0	15,73±0,72	2,34±0,12	1,90±0,11		4,42±0,27
Розмарин, 9%, твин-80	1000,0±30,0	16,13±0,73	2,10±0,11	1,90±0,10		7,45±0,35
Мелисса, 3%, твин-80	100,0±2,7	13,01±0,57	4,32±0,23	3,10±0,17		8,89±0,44
Мелисса, 5%, твин-80	200,0±5,3	24,67±1,06	4,53±0,23	9,90±0,55		11,27±0,65
Мелисса, 7%, твин-80	70,0±2,1	22,54±1,01	6,40±0,32	1,60±0,08		9,76±0,50
Мелисса, 9%, твин-80	20,0±0,5	46,32±2,08	7,24±0,43	0,40±0,02		15,69±0,81
Шалфей, 3%, твин-80	20,0±0,6	56,32±2,59	13,35±0,66	1,90±0,10		1,03±0,03
Шалфей, 5%, твин-80	18,0±0,4	63,82±2,80	17,58±0,88	2,30±0,13		2,80±0,15
Шалфей, 7%, твин-80	10,0±0,2	69,62±3,06	8,58±0,48	0,95±0,05		3,35±0,18
Шалфей, 9%, твин-80	150,0±4,5	73,20±3,29	6,36±0,32	2,60±0,14		6,90±0,37

Исходя из данных таблицы 3 минимальное значение толщины отмечается у образцов: Шалфей (7 %, Твин-80) – 0,01 мм; Шалфей (5 %, Твин-80) – 0,018 мм; Мелисса (9 %, Твин - 80), Шалфей (5 %) – 0,02 мм; Шалфей (3%) – 0,025 мм; Мелисса (7 %, Твин- 80) – 0,07 мм. Максимальное значение толщины отмечается у образцов: Розмарин (5%, Твин-80) – 0,8 мм; Розмарин (7%, Твин-80), (9 %, Твин-80) – 1 мм. Уменьшение толщины пленки при добавлении пластификатора (Твин-80) наблюдается у образцов: Мелисса, Шалфей. Увеличение толщины от добавления пластификатора наблюдается у контрольного образца и образца с добавлением эфирного масла розмарина. Таким образом, нельзя сделать однозначного вывода о влиянии пластификатора на толщину пленок. Здесь играет роль совокупность факторов – вид масла и его концентрация.

Прозрачность пленки позволяет органолептически анализировать упакованный продукт. Это качество особенно привлекательно для покупателей. Значения непрозрачности представлены в таблице 3. Максимальное значение непрозрачности наблюдается у образцов: Шалфей (3 %, Твин-80) – 13,356; Шалфей (5 %, Твин-80) – 17,580, Минимальное значение у образцов: Шалфей (5%) – 0,650; Шалфей (3%) – 0,720. Добавление пластификатора в состав пленки, увеличивает оптическую плотность у образцов: Шалфей (3%, 5%, 7%, 9%), Мелисса (9 %). При увеличении концентрации масел понижается прозрачность у образцов пленок с добавлением масла розмарина, мелиссы, это объясняется наличием кристаллических сгустков в следствие температурного влияния.

В таблице 3 можно наблюдать зависимость увеличения влагосодержания от концентрации масла у образцов: Розмарин (Твин-80) – от 13,74 % до 16,13 %; Мелисса (Твин-80) – от 13,01 % до 46,32 %; Мелисса – от 22,34 % до 56,21 %; Шалфей – от 55,11 % до 70,88 %; Шалфей (Твин-80) – от 56,32 % до 73,20 %. Это объясняется гидрофобным эффектом эфирных масел – с увеличением концентрации, на поверхности пленки образуется микроскопический слой, запечатывающий внутри

влагу, и одновременно действие пластификатора (Твин-80) оказывает стабилизирующее действие на молекулы водяного пара.

Паропроницаемость пленки – важный показатель для упаковочных материалов. Паропроницаемость позволяет поддерживать специальную газовую среду и оптимальную влажность для продуктов питания. Исходя из результатов в табл. 3, можно сделать вывод, что самое высокое значение наблюдается у образцов: Мелисса (5 %, Твин-80), Шалфей (9 %, Твин-80), – это определяется наличием микротрещин или порами, что способствует проникновению водяного пара. Данные образцы обладают самыми низкими барьерными характеристиками.

Самые высокие барьерные характеристики проявились у образцов: Шалфей (7 %), Мелисса (9 %, Твин-80), Мелисса (5 %, Твин-80), – это объясняется наличием в пленках кристаллических зон. Сравнивая данные из статьи Пэнг Ю. [14], где делали пленки на основе хитозана, можно сделать вывод, что пленки с добавлением эфирного масла шалфея (3%) и пластификатора имеют паропроницаемость выше примерно в 3 раза, чем пленка с добавлением черного чая (0,5%). Также можно отметить, что контрольные образцы пленок из полилактида имеют низкие барьерные свойства, а добавление эфирных масел в состав пленки способствует увеличению барьерных свойств.

Плавное увеличение степени растворимости наблюдается у масла шалфея, пик возрастания растворимости у масла розмарина наблюдается при концентрации 5 %. Скачок степени растворимости у масла мелиссы заметен при концентрации 9 %. Максимальное значение растворимости пленки с добавлением розмарина замечается при концентрации 5%, затем идет резкий спад, это объясняется увеличением концентрации маслянистой структуры, закупоривающей микропоры пленки, придавая более выраженные гидрофобные свойства образцу. Пластификатор увеличивает степень растворения, вне зависимости от концентрации и вида масла, это объясняется тем, что Твин-80 обладает способностью эмульгировать жиры. Плавное увеличение степени растворимости наблюдается у масла шалфея с добавлением пластификатора, пик возрастания растворимости у масла розмарина с добавлением пластификатора наблюдается при концентрации 7 %. У масла мелиссы с добавлением пластификатора наблюдается спад растворимости при 7 % и пик при 9 %. Сравнивая максимальные значения масел: степень растворения масла мелиссы больше примерно в два раза, чем значения масел шалфея и розмарина.

Выводы

В результате проведения эксперимента были получены активные биоразлагаемые пленки с перспективой использования их в упаковке продуктов питания с пролонгированным сроком годности. За счет включения антимикробных и антиоксидантных эфирных масел в состав упаковочного материала может продлиться срок годности пищевых продуктов и сохраняться их более высокое качество. Данные предположения планируется доказать в ходе дальнейшей экспериментальной работы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luck E., Jager M. (ed.) Antimicrobial Food Additives: Characteristics, Uses, Effects. Berlin: Springer, 1997. – 165 с.
2. Kourai H., Manabe Y., Yamada Y. Mode of bactericidal action of zirconium phosphate ceramics containing silver ions in the crystal structure. // J. of Antibacterial and Antifungal Agents. – 1994. – Т. 22. – С. 595-601.
3. Vermeiren L., Devlieghere F., Debevere J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts // Food Additives and Contaminants. – 2002. – Т. 10. – С. 77-86.
4. Vermeiren L., Devlieghere F., van Beest M., de Kruijf N., Debevere J. Developments in the active packaging of foods // Trends in Food Science and Technology. – 1999. Т. 19. – С. 163-171.
5. Коулз Р., МакДауэлл Д., Криван М. Дж. Упаковка пищевых продуктов /под научной редакцией Л.Г. Махотиной. – Санкт-Петербург: Профессия, 2008. – 402 с.
6. Fresh produce is keen as mustard to last longer // Packaging Week. – 1994. №10(21). – С.6.
7. Gray P.N. Generation of active Microatmosphere environments from and in packages. Proceedings of the «International Conference on Active and Intelligent Packaging. – Chipping Campden, Glos., UK: Campden & Chorleywood Food Research Association. 2000. –С. 56-60.

8. Rooney M.L. Active Food Packaging. – London, UK: Chapman & Hall, 1995. – 260 с.
9. Weng Y.M., Chen M.J., Chen W. Benzoyl chloride modified ionomer films as antimicrobial food packaging materials // International Journal of Food Science and Technology. – 1997. – Т. 32. – С. 229-234.
10. Fatin S.H., Mohamed I.M, Dalia F.K, Rana M.K. Antibacterial effect of Rosemary and Clove oil on Staph. aureus in minced meat // Benha veterinary medical journal. – 2016. Т. 31(2). – С. 124-129.
11. Дышлюк Л.С. Просеков А.Ю. Изучение термодинамическими методами потенциала природных композитов как основы биоразлагаемых пленок // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2018. № 22(2). – С. 29-41.
12. Tushar A., Seena J., Deenadayalan E., Satyendra M., Sellamuthu J., Palanivel S. Polylactic Acid (PLA) biocomposites filled with waste leather buff (WLB) // Journal of Polymers and the Environment. – 2017. Т. 25. – С. 1099-1109.
13. Ongaro A.E., Giuseppe D.D., Kermanizadeh A., Crespo A.M., Mencattini A., Ghibelli L., Mancini V., Wlodarczyk K.L., Hand D.P., Martinelli E., Stone V., Howarth N., La Carrubba V., Pensabene V., Kersaudy-Kerhoas M. Polylactic is a sustainable, low absorption, low autofluorescence alternative to other plastics for microfluidic and organ-on-chip applications // Analytical Chemistry. – 2020. Т. 92(9). – С. 6693-6701.
14. Peng Y., Wu Y., Li Y. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. Т. 59. – С. 282-289.

DEVELOPMENT OF ACTIVE BIODEGRADABLE PACKAGING FILMS WITH ESSENTIAL OILS

¹Borisova Anna Viktorovna, Candidate (Ph.D.) of Engineering Sciences,
Associate Professor, Associate Professor at the High Biotechnology School
²Shabanova Polina Vasil'evna, magistrate of the High Biotechnology School

^{1,2}Samara State Technical University, Samara, Russia, e-mail: ¹anna_borisova_63@mail.ru;
²shabanovapv@mail.ru

Active packaging is one of the promising ways to preserve food products. The inclusion of antimicrobials in the packaging materials prevents the growth of microorganisms and prolongs the shelf life of the product. The aim of the work was to develop an active biodegradable packaging film with the inclusion of essential oils in it. Active films of polylactide with essential oils of rosemary, lemon balm, sage with antioxidant properties have been developed. The physicochemical properties of the films, including vapor permeability, degree of swelling, dissolution, are determined. It is shown that the films have the potential to develop active packaging for food products.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ТЕХНОЛОГИИ ПОРОШКООБРАЗНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ПОВЫШЕННОЙ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ

¹Гаврилова Анастасия Андреевна, студентка кафедры пищевой биотехнологии

²Землякова Евгения Сергеевна, канд. техн. наук, доцент кафедры пищевой биотехнологии

^{1,2}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»,

Калининград, Россия, e-mail: ¹gavrilove1452va@mail.ru; ²evgeniya.zemljakova@klgtu.ru

Представлены исследования по технологии протеиновых коктейлей, обогащенных гидролизатом опорно-каркасных и покровных тканей судака, который содержит гликозаминогликаны, необходимые для профилактики заболеваний суставов. Определены показатели качества и биологическая ценность готового продукта.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема остеоартрита (ОА) имеет огромное медико-социальное значение во всем мире, в связи с тем, что продолжается рост заболеваемости населения этой патологией. Дегенеративно-дистрофические поражения суставов встречаются у 10-12% населения земного шара [2].

Хондроитин сульфат, содержащийся в хрящевой ткани, в настоящее время широко используется в качестве пищевой добавки при профилактике и лечении остеоартроза. Он входит в состав суставного хряща, выполняя важнейшие обменные и биомеханические функции. Являясь естественным компонентом элементов хряща, играет биологически активную роль во многих процессах метаболизма различных структур сустава.

Данный полисахарид относится к группе сульфатированных гликозаминогликанов. Эти соединения представляют собой линейные полимеры, состоящие из последовательно соединенных дисахаридных единиц, каждая из которых содержит гексозамин и уроновую кислоту или галактозу [1].

Цель исследования: разработка технологии продукта специализированного назначения в форме обогащенного протеинового коктейля в виде сухой смеси полезных компонентов растительного и животного происхождения, оказывающей профилактическое воздействие на течение и развитие заболеваний суставов; определить показатели качества и биологическую ценность готового продукта.

МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования являются процесс получения протеинового коктейля, обогащённого гидролизатом опорно-каркасных и покровных тканей судака с заменителем сахара.

В готовом порошке определяли общий химический состав. Оценку титруемой кислотности проводили по ГОСТ ISO 6091-2015. Определение влажности, витамина С, жира и золы проводили соответственно по ГОСТ 29246-91, ГОСТ 24556-89, ГОСТ 15113.9-77, ГОСТ 15113.8-77.

Содержание биофлавоноидов в двух экспериментальных образцах с малиной определяли методом окисления биофлавоноидов перманганатом калия в присутствии индигосульфокислоты.

Определены реологические свойства продукта: насыпная плотность, сыпучесть, угол естественного откоса, истинная плотность, относительная плотность, пористость.

Количественное определение гликозаминогликанов проводилось в лаборатории UBF (Untersuchungs-Beratungs-Forschungslaboratorium) в Германии. Лаборатория является сертифицированной.

Органолептическая оценка исследуемых образцов протеиновых коктейлей в сухом виде проводилась в соответствии с разработанной 5-балльной шкалой органолептической оценки.

Для оптимизации рецептуры обогащенных протеиновых коктейлей использовали ортогональный центральный композиционный план (ОЦКП) второго порядка для 2-х факторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1.1 Моделирование и оптимизация рецептуры протеинового коктейля

Планирование экспериментов при моделировании и оптимизации рецептуры обогащенного ванильного протеинового коктейля с жирностью сухого молока 26% осуществляли согласно ортогональному планированию второго порядка для двух факторов.

Диапазон измерения факторов, подлежащих оптимизации (M_c , M_r), а также пределы их варьирования, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Изменяемые факторы (дозировки сахарозаменителя и гидролизата), их интервалы и предельные значения

Факторы	Уровни			Интервал варьирования
	-1	0	+1	
Содержание сахарозаменителя, г	0,5	3	5,5	2,5
Содержание гидролизата, г	0,3	0,6	0,9	0,3

В качестве параметра оптимизации был выбран обобщенный параметр оптимизации, рассчитываемый с применением частных откликов методом приближения к идеалу (таблица 2).

Таблица 2

Частные отклики и их «идеальные» значения

Наименование частного отклика	Размерность измерения	«Идеальные» значения частного отклика
Органолептическая оценка порошка	Баллы	15
Сыпучесть порошка	г/с	Не менее 0,6

План эксперимента по моделированию и оптимизации по рецептуре обогащенного протеинового коктейля приведен в таблице 3.

Таблица 3

План эксперимента по моделированию и оптимизации по рецептуре обогащенного ванильного протеинового коктейля с жирностью сухого молока 26%

№ опыта	План эксперимента		Частные отклики		Безразмерные частные отклики		Обобщенные параметры оптимизации, y
	M_c	M_r	O, баллы	Сыпучесть, г/с	S_o^2	S_c^2	
1	5,5	0,9	8,76	0,27	0,173	0,303	0,476
2	0,5	0,9	13,06	0,48	0,017	0,040	0,057
3	5,5	0,3	11,59	0,65	0,052	0,007	0,059
4	0,5	0,3	13,13	0,88	0,016	0,218	0,234
5	5,5	0,6	8,06	0,55	0,214	0,007	0,221
6	0,5	0,6	12,6	0,75	0,026	0,063	0,089
7	3	0,9	13,6	0,91	0,009	0,267	0,276
8	3	0,3	13,72	0,74	0,007	0,054	0,061
9	3	0,6	14,67	0,67	0,0005	0,012	0,0125

Анализируя данные таблицы 3, было выявлено, что для качества протеинового коктейля

наиболее рациональными являются содержание сахарозаменителя 3 г и содержание гидролизата 0,6 г (опыт 9). Совокупность благоприятных значений частных откликов отразилась в минимальной величине обобщённого параметра оптимизации.

Расчёт основных коэффициентов математической модели проводился в соответствии с данными плана эксперимента, их значения приняли следующий вид (1-6):

$$b_0 = 0,165 \quad (1)$$

$$b_1 = -0,063 \quad (2)$$

$$b_2 = 0,076 \quad (3)$$

$$b_{12} = 0,148 \quad (4)$$

$$b_{11} = -0,019 \quad (5)$$

$$b_{22} = 0,091 \quad (6)$$

Используя полученные коэффициенты, строится математическая модель в кодированном виде (7):

$$y = 0,165 + 0,063X_1 + 0,076X_2 + 0,148X_1X_2 - 0,019(X_1^2 - 2/3) + 0,091(X_2^2 - 2/3) \quad (7)$$

Переход к натуральной модели проводился путем замены кодированных значений факторов их натуральными величинами (8, 9):

$$X_1 = (M_c - 3) / 2,5 \quad (8)$$

$$X_2 = (M_g - 0,6) / 0,3 \quad (9)$$

При переходе от кодированных значений факторов к их натуральным значениям (10) была установлена натуральная математическая модель рецептуры протеинового коктейля, которая пригодна не только для оптимизации, но и прогнозирования значений параметра оптимизации при варьировании факторами в виртуальных экспериментах:

$$y = -0,18829 - 0,2526M_c - 1,1376M_g + 0,0592M_cM_g - 0,00304M_c^2 + 1,01M_g^2 \quad (10)$$

Рассчитываем оптимальные значения пищевых добавок в рецептуре ванильного протеинового коктейля с жирностью сухого молока 26% через дифференцирование натуральных моделей (11,12):

$$dy/dx_1 = -0,2526 - 0,00608M_c + 0,0592M_g \quad (11)$$

$$dy/dx_2 = -1,1376 + 2,02M_g + 0,0592M_c \quad (12)$$

Расчётные оптимальные значения дозировок:

- содержание сахарозаменителя $M_c = 3,09$ г;

- содержание гидролизата $M_g = 0,62$ г.

Принимаем в рецептуру следующие значения

- содержание сахарозаменителя $M_c = 3,1$ г;

- содержание гидролизата $M_g = 0,62$ г.

1.2 Определение показателей биологической ценности белка протеинового коктейля расчетным методом

Важными понятиями, характеризующими качество поступающего белка, являются биологическая ценность, наличие в белке незаменимых аминокислот (НА) и способность их усваиваться организмом. Чем больше пищевой белок по аминокислотному составу приближен к составу белка организма человека, тем выше его биологическая ценность.

Поэтому на следующем этапе был рассчитан аминокислотный скор (АС) смеси сухого молока и соевого протеина (таблица 4). Этот показатель представляет собой отношение содержания аминокислот в исследуемом белке к его количеству в эталонном белке. Эталонном служило содержание незаменимых аминокислот в белке женского молока.

Установлено, что белок исследуемой смеси является полноценным и содержит все незаменимые аминокислоты. Для полного усвоения белка пищи содержание в нем аминокислот должно отвечать определенным соотношениям, то есть быть сбалансированным, так как недостаточное количество даже одной аминокислоты снижает уровень включения других в синтез белков организма. Белки высокой биологической ценности отличаются сбалансированностью аминокислот, легкой перевариваемостью и хорошей усвояемостью.

Таблица 4

Аминокислотный скор смеси сухого молока и соевого изолята

Название НАК	Содержание НА в 1 г исследуемого белка, мг	Содержание НА в 1 г эталонного белка, мг	АС, %	КРАС, %	БЦ, %
Изолейцин	58	40	145	36,8	63,2
Лейцин	94	70	134		
Лизин	74	55	135		
Метионин+ цистин	31	35	89		
Фенилаланин+тирозин	104	60	173		
Треонин	43	40	108		
Триптофан	15	10	150		
Валин	59	50	118		

Коэффициент различия аминокислотного сора (КРАС) показывает среднюю величину избытка АС незаменимых АК по сравнению с наименьшим уровнем сора какой-либо незаменимой АК (избыточное количество незаменимых АК, не используемых на пластические нужды), %.

БЦ – биологическая ценность пищевого белка, %.

1.3 Разработка рецептуры обогащенного протеинового коктейля

В результате проведенных экспериментов, было получено 9 образцов протеинового коктейля, среди которых, опираясь на органолептическую оценку и сыпучесть, был выбран 9 образец с наиболее рациональной рецептурой. Данный образец обладал наиболее сбалансированным вкусом и запахом.

Проведенные испытания позволили получить оптимальную рецептуру протеинового коктейля, (таблица 5). Всего было разработано 4 образца обогащенных протеиновых коктейлей:

Образец 1 – обогащенный протеиновый коктейль со вкусом ванили на основе жирного молока (рис. 1);

Образец 2 - обогащенный протеиновый коктейль со вкусом ванили на основе обезжиренного молока (рис. 2);

Образец 3 - обогащенный протеиновый коктейль со вкусом малины на основе жирного молока (рис. 3);

Образец 4 - обогащенный протеиновый коктейль со вкусом малины на основе обезжиренного молока (рис. 4).

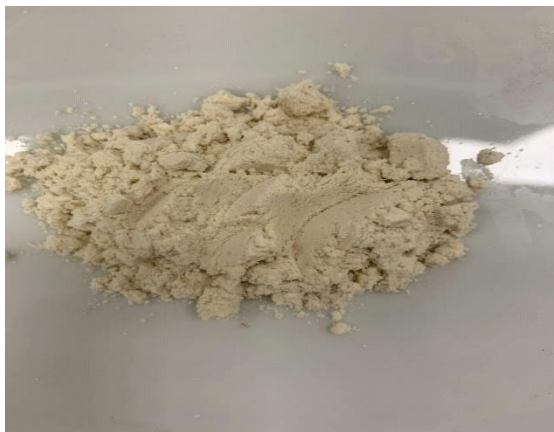


Рис. 1. Обогащенный протеиновый коктейль со вкусом ванили на основе жирного молока

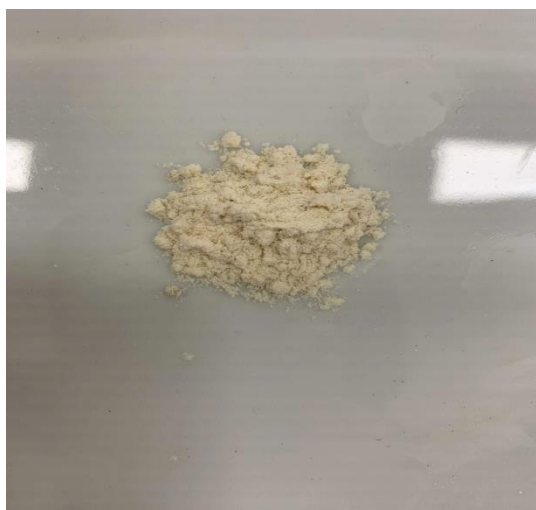


Рис. 2. Обогащенный протеиновый коктейль со вкусом ванили на основе обезжиренного молока



Рис. 3. Обогащенный протеиновый коктейль со вкусом малины на основе жирного молока



Рис. 4. Обогащенный протеиновый коктейль со вкусом малины на основе обезжиренного молока

Таблица 5

Рецептура обогащенных протеиновых коктейлей на порцию (30 г) готового продукта

Наименование ингредиента	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Сухое молоко (26%), г	13,1	-	11,00	-
Сухое молоко обезжиренное, г	-	13,3	-	11,00
Соевый изолят, г	13,1	13,3	11,00	11,00
Сахарозаменитель, г	3,1	3	3	3
Ксантановая камедь, г	0,03	0,03	0,03	0,03
Гидролизат опорно-каркасных и покровных тканей судака, г	0,62	0,3	0,3	0,3
Малина, г	-	-	5	5
Ванилин, г	0,05	0,05	-	-

1.4 Оценка пищевых и качественных показателей протеиновых коктейлей

В таблицах 6 и 7 представлен физико-химический состав образцов обогащенного протеинового коктейля.

Таблица 6

Общий физико-химический и витаминный состав образцов обогащенного протеинового коктейля в порции

Наименование показателя	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Калорийность, ккал	150,76	100,63	142,00	97,62
Белки, г	15,1	16,4	15,1	16,4
Жиры, г	8,9	0,6	8,9	0,6
Углеводы, г	0,39	6,94	0,4	6,18
Влага, %	4,68	5,12	4,64	5,88
Зола, %	0,93	0,94	0,97	0,94
Пищевые волокна, г	-	-	3,6	3,6
Витамин С, мг	-	-	3,189	4,326
Витамин В ₁ , мг	0,148	0,152	0,149	0,153
Витамин В ₂ , мг	0,212	0,278	0,214	0,281
Ниацин, мг	0,398	0,464	0,428	0,494
Витамин А, мкг	17,22	-	-	-

Кислотность, град	-	-	51	48
Биофлаванойды, %	-	-	0,183	0,234
ГАГ, мг	54	27	27	27

Таблица 7

Общий минеральный состав обогащенных образцов протеинового коктейля на порцию готового продукта [3]

Минеральное вещество	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Na, мг	239,16	244,72	239,66	245,22
K, мг	169,73	172,91	180,93	184,11
Ca, мг	156,08	176,62	158,08	178,62
Mg, мг	20,94	26,37	22,04	27,47
P, мг	207,49	224,72	209,34	226,57
Fe, мг	1,99	2,05	2,05	2,11

Одним из наиболее важных показателей качества протеиновых коктейлей являются их реологические свойства.

Определены такие показатели, как: истинная плотность (ρ , г / см³), насыпная плотность (ρ_n , г / см³), относительная плотность ($\tau_{л}$, %), пористость (П, %), угол естественного откоса, сыпучесть (таблица 8).

В зависимости от насыпной плотности (массы единицы объема свободно насыпанного порошкообразного материала) различают «тяжелые», «средние» и «легкие» порошки. Для «легких» насыпная плотность характеризуется величиной менее 0,6 г/см³, тогда как для «средних» и «тяжелых» порошков может варьироваться в диапазоне 0,6-1,1 и 1,1-2,0 г/см³ соответственно. По значению максимальной насыпной плотности можно прогнозировать объемы производственных емкостей, вовлеченных в технологический процесс.

Сыпучесть порошков также является важным свойством, обеспечивающим возможность нанесения их равномерным по толщине слоем. Она зависит от внутреннего трения между частицами порошка и определяется по углу естественного откоса: чем меньше угол естественного откоса, тем выше сыпучесть порошка. Угол естественного откоса – это угол между образующей конуса из сыпучего материала и горизонтальной плоскостью

В зависимости от значения угла естественного откоса все порошки дифференцируются по сыпучести на следующие уровни:

- «очень хорошая» ($\alpha=25-30^\circ$); – «хорошая» ($\alpha=31-35^\circ$);
- «удовлетворительная» ($\alpha=36-45^\circ$); – «неудовлетворительная» ($\alpha=46-55^\circ$);
- «плохая» ($\alpha=56-65^\circ$); – «очень плохая» ($\alpha=\text{более } 66^\circ$) [4]

Таблица 8

Технологические показатели порошков

Показатель	Образец			
	1	2	3	4
Насыпная плотность, г/см ³	0,4488	0,4312	0,5292	0,4444
Сыпучесть, г/с	0,67	1,14	0,52	1,08
Угол естественного откоса, °	50	40	50	40
Истинная плотность, г/см ³	0,780	0,763	0,737	0,722
Относительная плотность, %	57,5	56,5	71,8	61,55
Пористость, %	42,5	43,5	28,2	38,45

Была проведена органолептическая оценка качества двух видов протеиновых коктейлей (малинового и ванильного) в таблицах 2.13 и 2.14.

Органолептическая оценка качества ванильного протеинового коктейля

Показатель	Баллы	Кзн	Значения
Внешний вид и консистенция	5,00	0,8	4,00
Вкус	4,33	1,0	4,33
Запах (аромат)	5,00	0,7	3,50
Цвет	4,33	0,5	2,16
Суммарная органолептическая оценка			13,99

Таблица 10

Органолептическая оценка качества малинового протеинового коктейля

Показатель	Баллы	Кзн	Значения
Внешний вид и консистенция	5,00	0,8	4,00
Вкус	4,00	1,0	4,00
Запах (аромат)	4,00	0,7	2,80
Цвет	4,66	0,5	2,33
Суммарная органолептическая оценка			13,13

Образец, содержащий малину, получил меньшую органолептическую оценку (13,13), чем образец с ванилином (13,99). Оба продукта превосходного качества.

Результаты органолептической оценки протеинового коктейля в сухом и разведенном состоянии (30 г смеси на 130-150 мл жидкости), представлены в таблицах 11 и 12 соответственно.

Таблица 11

Результаты органолептической оценки протеиновых коктейлей хондропротекторной направленности в сухом виде

Показатель	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Внешний вид и консистенция	Порошкообразный продукт, состоящий из единичных и/или агломерированных частиц с присутствием мелких по размеру частиц характерных для входящих компонентов с незначительными признаками деформации. Допускается наличие незначительного количества комочков, рассыпающихся при лёгком механическом воздействии.	Порошкообразный продукт, состоящий из единичных и/или агломерированных частиц с присутствием мелких частиц характерных для входящих компонентов, имеющих правильную форму. Допускается наличие незначительного количества комочков, рассыпающихся при лёгком механическом воздействии.	Порошкообразный продукт, состоящий из единичных и/или агломерированных частиц с присутствием мелких или средних по размеру частиц характерных для входящих компонентов с незначительными признаками деформации. Допускается наличие незначительного количества комочков, рассыпающихся при лёгком механическом воздействии.	Порошкообразный продукт, состоящий из единичных и/или агломерированных частиц с присутствием мелких частиц характерных для входящих компонентов, имеющих правильную форму. Допускается наличие незначительного количества комочков, рассыпающихся при лёгком механическом воздействии.
Цвет	Однородный, от светло-желтого до желтого с мелкими включениями характерного цвета гидролизата (от темно-оранжевых до коричневых)	Однородный, от светло-желтого до желтого с мелкими включениями характерного цвета гидролизата (от темно-оранжевых до коричневых)	Однородный, от светло-розового до розового с мелкими включениями характерного цвета гидролизата (от темно-оранжевых до коричневых)	Однородный, от светло-розового до розового с мелкими включениями характерного цвета гидролизата (от темно-оранжевых до коричневых)
Запах (аромат)	Приятный, свойственный основным ингредиентам смеси с легким ароматом ванили, посторонние	Приятный, свойственный основным ингредиентам смеси с легким ароматом ванили,	Приятный, свойственный основным ингредиентам смеси с легким ароматом малины, посторонние запахи	Приятный, с легким ароматом малины, с присутствием запаха гидролизата, рыбный

Показатель	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
	запахи отсутствуют	посторонние запахи отсутствуют	отсутствуют	или посторонние запахи отсутствуют
Вкус	Приятный, свойственный основным ингредиентам смеси, ванильный, без посторонних привкусов	Приятный, свойственный основным ингредиентам смеси, ванильный, без посторонних привкусов	Приятный, свойственный основным ингредиентам смеси, малиновый, без посторонних привкусов	Приятный, малиновый, с легким горьким привкусом, характерным для вносимого гидролизата, посторонние привкусы отсутствуют

Таблица 12

Результаты органолептической оценки протеиновых коктейлей хондропротекторной направленности в разведенном в теплой воде виде

Показатель	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Цвет	Однородный, желтый. Видны включения, характерные для вносимых добавок, мелкие, равномерно распределенные по всему объему	Однородный, светло-желтый. Видны включения, характерные для вносимых добавок, мелкие, равномерно распределенные по всему объему	Однородный, розовый. Видны включения, характерные для вносимых добавок, мелкие, равномерно распределенные по всему объему	Однородный, светло-розового до розового. Видны включения, характерные для вносимых добавок, мелкие, равномерно распределенные по всему объему
Вкус	Приятный молочный вкус с присутствием привкуса ванили, посторонние привкусы отсутствуют	Приятный молочный вкус с присутствием привкуса ванили, посторонние привкусы отсутствуют	Приятный молочный вкус с присутствием привкуса малины, посторонние привкусы отсутствуют	Приятный молочный вкус, малиновый, с небольшим горьким привкусом
Запах (аромат)	Чистый молочный запах с легким присутствием запаха ванили	Чистый молочный запах с легким присутствием запаха ванили	Чистый молочный запах с легким присутствием запаха малины	Специфический, со слабо-выраженным молочным, малиновым запахом и присутствием других посторонних запахов
Консистенция	Однородная, в меру густая. Присутствует небольшой слой пены после взбалтывания	Однородная, в меру густая. Присутствует небольшой слой пены после взбалтывания	Однородная, избыточно густая, ощущаются частицы внесенного гидролизата, равномерно распределенного по всему объему. Присутствует небольшой слой пены после взбалтывания	Однородная, недостаточно густая, ощущаются частицы внесенного гидролизата, равномерно распределенного по всему объему. Присутствует небольшой слой пены после взбалтывания

В ходе исследования была достигнута цель, выполнены все поставленные задачи:

1) Обоснован выбор сырья и обогащающего компонента – гидролизата опорно-каркасных и покровных тканей судака, который служит источником глюкозаминогликанов – хондропротекторов дегенеративно-дистрофических заболеваний.

2) Разработана рецептура обогащенного протеинового коктейля с помощью математического моделирования и органолептическим методом.

Основным сырьем: сухое молоко (обезжиренное и жирностью 26%), соевый изолят, сахарозаменитель (эритрит, экстракт стевии), ксантановая камедь, гидролизат опорно-каркасных и покровных тканей судака.

Дополнительное сырье – сублимированная малина и ванилин.

Разработано четыре образца протеиновых коктейлей:

Образец 1 – обогащенный протеиновый коктейль со вкусом ванили на основе жирного молока;

Образец 2 - обогащенный протеиновый коктейль со вкусом ванили на основе обезжиренного молока;

Образец 3 - обогащенный протеиновый коктейль со вкусом малины на основе жирного молока;

Образец 4 - обогащенный протеиновый коктейль со вкусом малины на основе обезжиренного молока.

3) Проведен анализ качества на порцию готового продукта во всех 4-х образцах. Определено содержание сухих веществ, жира. В образцах с малиной определено содержание витамина С, биофлавоноидов, кислотность продукта.

Определены такие показатели, как: истинная плотность (ρ , г / см³), насыпная плотность (ρ_n , г / см³), относительная плотность (τ_l , %), пористость (П, %), угол естественного откоса, сыпучесть.

Значение сыпучести зависит от угла откоса. В образцах с обезжиренным молоком угол откоса 40°, что свидетельствует об удовлетворительной сыпучести.

Так как насыпная плотность у экспериментальных образцов менее 0,6 г/см³, то они относятся к легким порошкам.

Рассчитали аминокислотный скор и биологическую ценность белка.

4) Проведен органолептический анализ и составлена органолептическая характеристика четырёх образцов обогащенных протеиновых коктейлей в сухом и растворенном виде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Капустина, Н.В. Оценка эффективности лечения хондроитин сульфатом (Артрадол) спортсменов с посттравматической хондропатией коленных суставов / Н.В. Капустина // Русский медицинский журнал. – 2013. - № 32. – С. 1672-1677.

2. Сарвилина, И.В. Сравнительный клинико-экономический анализ применения препаратов SYSADOA, содержащих хондроитина сульфат или влияющих на его биосинтез, для лечения пациентов с остеоартрозом коленных суставов II стадии / И.В. Сарвилина, А.Н. Галустян, А.К. Хаджидис, И.С. Сардарян, Н.В. Лавров, О.А. Громова, Ю.С. Прокофьева // Современная Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология. – 2019. - № 4. – С. 255 – 266.

3. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник / Под ред. член-корр. МАИ, проф. И. М. Скурихина и академика РАМН, проф. В. А. Тутельяна. - М.: ДеЛи принт, 2002. - 236 с.

4. Государственная фармакопея 13 издание (ГФ XIII). ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ. Степень сыпучести порошков ОФС.1.4.2.0016.15.

RESEARCH ON THE TECHNOLOGY OF POWDER FOOD PRODUCTS OF INCREASED NUTRITIONAL VALUE

¹Gavrilova Anastasia Andreevna, student

²Zemljakova Evgeniya Sergeevna, PhD in Engineering, associate professor

^{1,2}Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia,

e-mail: ¹gavrilove1452va@mail.ru; ²evgeniya.zemljakova@klgtu.ru

The article presents studies on the technology of protein cocktails enriched with hydrolyzate of the support-frame and integumentary tissues of pike perch, which contains glycosaminoglycans necessary for the prevention of joint diseases. The quality indicators and the biological value of the finished product are determined.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ АКВАТОКСИНОВ В ВОДЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

¹Гендриксон Ольга Дмитриевна, канд. хим. наук, ст. научн. сотрудник

²Зверева Елена Анатольевна, канд. биол. наук, ст. научн. сотрудник

³Жердев Анатолий Виталиевич, канд. биол. наук, ведущий науч. сотрудник

⁴Дзантиев Борис Борисович, д-р хим. наук, профессор, заведующий лабораторией

^{1,2,3,4}Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук,
Москва, Россия, e-mail: ¹odhendrick@gmail.com

Акватоксины – группа токсинов, продуцируемых некоторыми видами водорослей и цианобактерий и распространяющихся по пищевым цепям водоемов. Потенциальное загрязнение аквакультурной продукции акватоксинами требует применения производительных скрининговых методов для своевременного контроля ее безопасности. В работе предложены экспрессные иммунохроматографические тест-системы для детекции двух акватоксинов – фикотоксина окадаевой кислоты (ОК) и цианотоксина микроцистина-LR (МЦ). Высокая чувствительность определения ОК и МЦ достигается за счет ряда подходов, направленных на усиление регистрируемого аналитического сигнала. Разработанные форматы иммунохроматографического анализа (ИХА) позволяют снизить предел обнаружения акватоксинов в 2–11 раз. Все варианты усиленного ИХА успешно апробированы для выявления ОК и МЦ в пробах морской и пресной воды, рыбы и морепродуктов.

1. Введение

Влияние человека на окружающую среду непрерывно растет. Активное поступление соединений азота и фосфора с неочищенными сточными водами приводит к эвтрофикации водоемов и бурному развитию водорослей и цианобактерий, продуктами жизнедеятельности которых могут быть крайне опасные для здоровья акватоксины [1]. Кроме того, происходящее изменение климата на планете влияет на характеристики водных ресурсов и распространение акватоксинов в водоемах Мирового океана [2]. Поступая в организм человека с продуктами аквакультуры, акватоксины могут вызывать острое отравление и оказывать хроническое воздействие [3]. К наиболее токсичным и распространенным акватоксинам относятся диарейные токсины и гепатотоксины, представителями которых являются фикотоксин окадаевая кислота (ОК) и цианотоксин микроцистин-LR (МЦ) [4, 5], соответственно. Содержание акватоксинов в пищевых продуктах строго регламентируется. Так, согласно Техническому Регламенту Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», содержание ОК в тканях моллюсков не должно превышать 0.16 мкг/кг [6]. Европейским Союзом введен норматив для контроля МЦ в питьевой воде, устанавливающий максимально допустимую концентрацию, равную 1 мкг/л [7].

Наиболее распространенным методом определения акватоксинов является жидкостная хроматография (ЖХ) с различными типами детекторов [8]. ЖХ позволяет проводить высокочувствительный анализ и выявлять структурно сходные аналиты, однако этот метод требует сложного дорогостоящего оборудования и реализуется в специализированных лабораториях квалифицированным персоналом. Для скринингового тестирования проб на наличие акватоксинов оптимальны иммуноаналитические методы, в частности, иммунохроматографический анализ (ИХА) [9]. Иммунохроматографические тест-полоски, на мембранах которых предварительно иммобилизованы специфические иммунореагенты, готовы к использованию и не требуют дополнительного приборного или реагентного обеспечения, а, следовательно, их можно эффективно использовать во вне лабора-

торных условиях [10]. Риски, связанные с загрязнением воды, рыбы и морепродуктов акватоксинами, определяют большой интерес к разработке ИХА и созданию на его основе экспрессных и чувствительных тест-систем [9].

Следует отметить, что пробоподготовка перед анализом пищевых и водных матриц, контаминированных акватоксинами, часто включает многократное разведение тестируемых проб, что приводит к снижению концентрации содержащегося в них аналита. Поэтому тест-системы с низкими ПрО акватоксинов крайне востребованы. К подходам, направленным на увеличение чувствительности анализа, относятся вариации физико-химических свойств (состава, формы, размера и т.д.) детектируемых меток и действия, направленные на увеличение количества метки в зонах тест-полосок [11]. Эти подходы обеспечивают усиление аналитического сигнала, что позволяет существенно снижать концентрации специфических реагентов, достигая низкие ПрО аналитов без ущерба для достоверности и воспроизводимости результатов анализа.

В данном исследовании были разработаны высокочувствительные форматы ИХА ОК и МЦ, основанные на усилении аналитического сигнала, которое обеспечивается за счет типа используемого маркера и/или способа реализации иммунных взаимодействий.

2. Материалы и методы

В работе использовали ОК, золотохлористоводородную кислоту (ЗХВК), гидрохинон, нитрат серебра, гексагидрат гексахлороплатината (IV) натрия, 3,3'-диаминобензидин (ДАБ), пероксидазу из корней хрена (ПХ), Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США), МЦ (Enzo Life Science, Швейцария), моноклональные антитела (МАТ) к МЦ (Eximio Biotec, Китай), конъюгат МЦ с бычьим сывороточным альбумином (МЦ-БСА, Unibiotest, Китай), антитела козы против иммуноглобулинов мыши (АК), антитела осла против иммуноглобулинов козы (АО, Arista Biologicals, США), МАТ к ОК (Santa Cruz Biotechnology, США), карбоксилированные магнитные частицы (МЧ) (Magsphere, США).

Конъюгаты ОК-БСА и АК-МЧ-ПХ синтезировали методом карбодимидной активации [12]. Наночастицы золота (НЧЗ) синтезировали восстановлением ЗХВЧ цитратом натрия [13]. Наноцветы золота (НЦЗ) получали методом дорастивания НЧЗ согласно [14]. Биметаллические нанозимы типа «ядро-оболочка» (Au@Pt) синтезировали на основе НЧЗ, как описано в [15]. Конъюгаты АК-НЧЗ, АК-НЦЗ и АК-Au@Pt получали по методике, описанной в работах [15, 16], с нагрузкой антител, определенной согласно [16]. Характеристику частиц и их конъюгатов проводили методом просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе CX-100 (Jeol, Япония), как описано в [17].

Для получения иммунохроматографических тест-систем на основе НЧЗ, НЦЗ и нанозима использовали нитроцеллюлозные рабочие мембраны CNPC-SS15 (Advanced Microdevices, Индия). Для ИХА на основе МЧ применяли рабочую мембрану Hi-Flow Plus HF075 (Millipore, США). В качестве мембраны под пробу и впитывающей мембраны применяли носители GFB-R4 и APO45 (Advanced Microdevices, Индия), соответственно. Тестовые (Т) зоны формировали, нанося на рабочую мембрану МЦ-БСА или ОК-БСА (0.5 мг/мл) в 50 мМ фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, содержащем 100 мМ NaCl (ФСБ), с помощью автоматического диспенсера Iso-Flow (Image Technology, США). Контрольную (К) зону формировали нанесением АО (0.15 мг/мл) в ФСБ. Мультимембранные композиты нарезали на тест-полоски шириной 3 мм с помощью автоматической гильотины (KinBio, Китай).

Для реализации ИХА смешивали растворы МЦ или ОК с МАТ против МЦ или ОК, соответственно, и конъюгатом АК с маркером (НЧЗ, НЦЗ, МЧ или нанозимом). Через несколько минут в смесь опускали тест-полоски и инкубировали 10–20 мин. При использовании в качестве маркера НЧЗ или НЦЗ тест-полоски извлекали, промокали жидкость с поверхности и сканировали. Интенсивность окрашивания зон определяли с помощью программы TotalLab (Великобритания). При реализации ИХА с усилением серебром тест-полоски извлекали, добавляли смесь растворов гидрохинона и нитрата серебра, инкубировали 10 мин при 37°C и обрабатывали, как описано выше. При проведении ИХА с МЧ и пероксидазным усилением или нанозимом в качестве маркера тест-полоски извлекали, добавляли субстратный раствор на основе ДАБ, инкубировали 1–3 мин и обрабатывали, как описано выше. Графики интенсивности окрашивания тестовых зон в зависимости от концентрации ОК и МЦ строили с использованием программного обеспечения Origin (OriginLab,

США). Инструментальный и визуальный ПрО, а также рабочие диапазоны определяемых концентраций вычисляли, как описано в [18].

При детекции акватоксинов в морской и пресной воде вместо буфера использовали контаминированные пробы воды. Пробоподготовку морской воды (Эгейское море, Турция) проводили, добавляя в пробу Тритон X-100 (0.05%), а затем разбавляя ее в 10 раз ФСБ, содержащим 0.05% Тритона X-100 (ФСБТ). Пробы пресной воды (водопроводная вода, г. Москва, бутилированная родниковая негазированная вода, г. Кострома, прудовая вода, Московская область) разбавляли в 2 раза деионизированной водой, содержащей 0.05% Тритона X-100.

Для подготовки проб рыбы (форель, треска) и морепродуктов (кальмары, осьминоги, мидии и креветки), приобретенных в супермаркетах г. Москва, использовали два подхода. Перед ИХА пробы гомогенизировали и контаминировали МЦ либо ОК. Экстракцию МЦ проводили 5% раствором уксусной кислоты, содержащим 0.01 М ЭДТА [19]. Полученные экстракты центрифугировали, выпаривали супернатанты, а остатки растворяли в ФСБТ и использовали для ИХА. Экстракцию ОК проводили смесью метанол-вода, 1:1 [20]. Полученные экстракты обрабатывали, как описано выше.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Получение и характеристика иммунореагентов

Для разработки ИХА в различных форматах была синтезирована панель маркеров на основе НЧЗ, НЦЗ, а также нанозима Au@Pt (МЧ являлись коммерческим препаратом) и их конъюгатов с антителами. Результаты характеристики маркеров методом ПЭМ представлены на рис. 1. Как видно из микрофотографий, препараты НЧЗ и НЦЗ (рис. 1 а, б) содержали гомогенные сферические наночастицы с однородной (НЧЗ) или игольчатой (НЦЗ) поверхностью и диаметром около 30 и 80 нм, соответственно. Размер сферических неагрегированных МЧ варьировал в диапазоне 300 нм – 1 мкм (рис 1 в). Нанозим представлял собой сферические частицы с игольчатой поверхностью диаметром 20–50 нм (рис. 1 г).

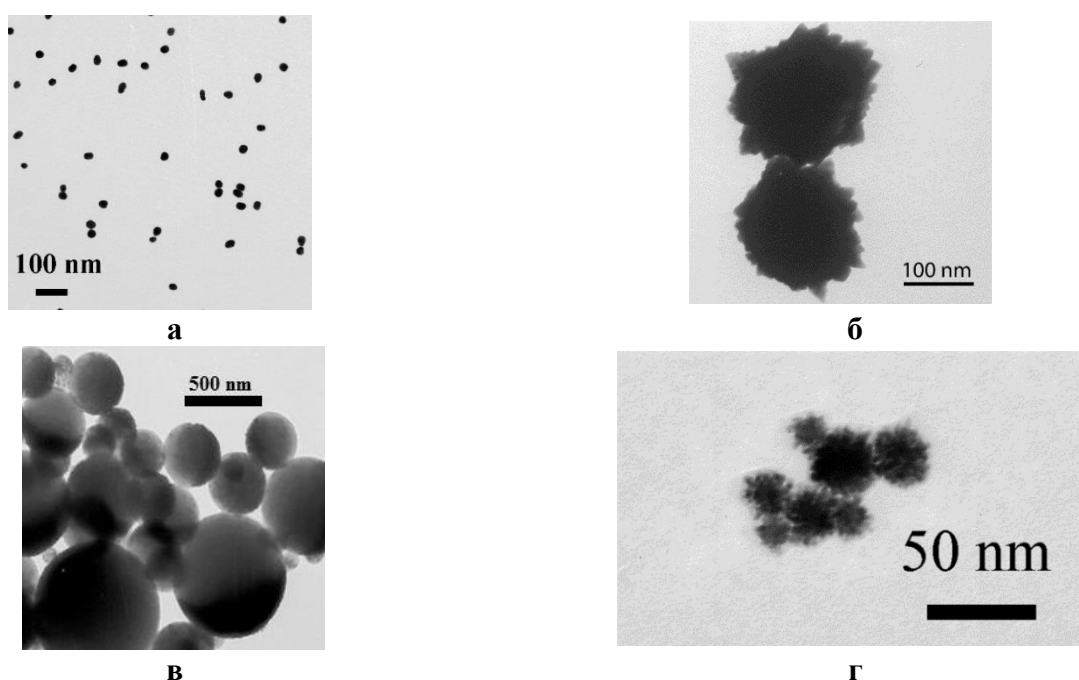


Рис. 1. Микрофотографии НЧЗ (а), НЦЗ (б), МЧ (в) и нанозима Au@Pt (г)

ИХА (как стандартные, так и усиленные схемы) реализовали в непрямом конкурентном формате, подразумевающим конъюгацию с маркером антивидовых антител. Как было показано в наших предыдущих исследованиях, непрямой ИХА обеспечивает существенный выигрыш в чувствительности детекции по сравнению с прямым анализом, где метку присоединяют к антителам, специфическим к аналиту [17, 22]. НЧЗ, НЦЗ и нанозим Au@Pt конъюгировали с вторичными антителами

(АК) физической адсорбцией, предварительно определив методом флоккуляционных кривых концентрацию антител, достаточную для стабилизации поверхности метки (6 мкг/мл) [16]. МЧ конъюгировали с АК и/или ПХ с помощью карбодимидной активации карбоксилированной поверхности частиц. АК и ПХ иммобилизовали на МЧ в концентрации 0.15 мкг/мл.

В качестве рецепторов акватоксинов использовали коммерческие препараты специфических МАТ. Иммунные свойства МАТ к ОК и МЦ характеризовали методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). ПрО ОК в ИФА составил 0.5 нг/мл, а МЦ – 0.01 нг/мл. Полученные результаты позволили перейти к разработке ИХА акватоксинов.

3.2. ИХА микроцистина на основе наночастиц золота

Коллоидное золото, характеризующееся плазмонными свойствами, может образовывать золи, цвет которых определяется формой и размером частиц [22]. Сферические НЧЗ являются традиционными метками в ИХА, генерирующими стабильное и воспроизводимое окрашивание зон тест-полосок в красный цвет [23]. Колориметрический сигнал НЧЗ может быть зарегистрирован как визуально, так и инструментально. В ИХА с усилением применялась метка на основе НЦЗ, имеющих отличную от НЧЗ геометрию поверхности, что позволило окрашивать зоны в синий цвет, увеличивая их яркость, контрастность и, как следствие, повышая чувствительность определения.

ИХА с НЧЗ и НЦЗ реализовали в непрямом конкурентном формате. Для этого на рабочей мембране тест-полоски формировали Т- и К-зону с иммобилизацией белкового конъюгата акватоксина и АК, соответственно. Непрямой ИХА включал две стадии: предварительную инкубацию пробы, содержащей МЦ, с МАТ и мечеными антивидовыми антителами, а затем инкубацию тест-полоски с этой смесью. Если акватоксин в пробе отсутствует, специфические антитела связываются с конъюгатом АК–НЧЗ или АК–НЦЗ, и образовавшиеся комплексы перемещаются с током жидкости в Т-зону и концентрируются там с образованием первой окрашенной линии. Избыток меченых антител двигается в К-зону и взаимодействует с иммобилизованными АО, образуя вторую окрашенную линию. При наличии МЦ в пробе последний взаимодействует с МАТ, блокируя их активные центры и препятствуя специфическому связыванию с белковым конъюгатом в Т-зоне. Следовательно, окрашивания там не происходит. Таким образом, интенсивность окрашивания Т-зоны отражает концентрацию акватоксина в пробе. Протоколы ИХА с НЧЗ и НЦЗ были оптимизированы для достижения минимальных ПрО МЦ при высоких амплитудах аналитического сигнала, что включало варьирование и выбор концентраций свободных и иммобилизованных специфических реагентов и продолжительностей стадий анализа. В оптимизированных условиях инструментальные/визуальные ПрО МЦ составили 0.2/1 и 0.1/1 нг/мл для ИХА с использованием НЧЗ и НЦЗ, соответственно (калибровочные кривые представлены на рис. 2 а). Рабочие диапазоны определяемых концентраций МЦ при этом составляли 0.3–0.8 и 0.2–0.7 нг/мл; время анализа – 18 мин для обоих форматов ИХА. Изображения тест-полосок после ИХА с НЧЗ и НЦЗ представлены на рис. 2 б, в. Таким образом, изменение размера и формы золотых маркерных частиц позволило снизить инструментальный ПрО МЦ в 2 раза.

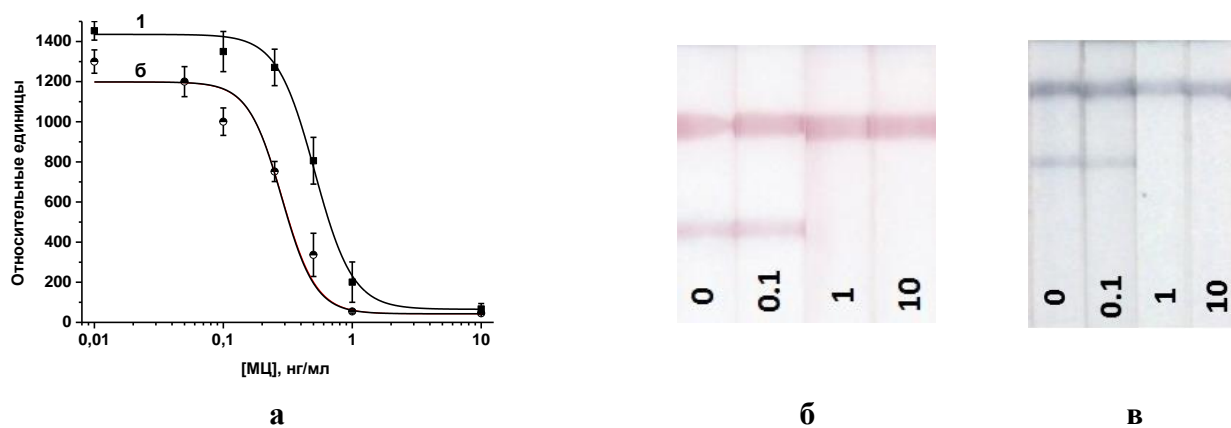


Рис. 2. Калибровочные кривые МЦ в ИХА с НЧЗ (кривая 1) и НЦЗ (кривая 2) в качестве маркера (а); изображения тест-полосок в ИХА с НЧЗ (б) и НЦЗ (в). Цифрами на тест-полосках обозначены концентрации МЦ в пробах (нг/мл)

Разработанный усиленный ИХА был апробирован для детекции МЦ в пробах, загрязненных акватоксином. Тестируемые пробы включали рыбу (треска), мидии, креветки, осьминоги и кальмары. Показано, что тест-системы позволяют качественно определять МЦ в загрязненных пробах.

3.3. ИХА микроцистина на основе наночастиц золота с усилением серебром

В данном формате для увеличения чувствительности ИХА МЦ применялось усиление колориметрического сигнала, основанное на восстановлении ионов серебра на поверхности НЧЗ в качестве метки. Предложенный подход способствовал росту детектируемого оптического сигнала. ИХА проводили, как описано в разделе 3.2. После стандартной процедуры анализа на тест-полоски нанесли смесь гидрохинона и нитрата серебра, что приводило к восстановлению ионов серебра на НЧЗ и образованию в Т-зоне высококонтрастных интенсивно окрашенных полос черного цвета. Использование усиления позволило снизить концентрации иммобилизованного белкового конъюгата МЦ в Т-зоне и специфических МАт в растворе и, благодаря этому, увеличить чувствительность анализа. В оптимизированных условиях инструментальные и визуальные ПрО МЦ составили 0.2/1 нг/мл и 0.05/0.5 нг/мл для стандартного и усиленного ИХА, соответственно. Калибровочная кривая МЦ и изображение тест-полосок представлены на рис. 3. Как видим, достигнут двух-четырёхкратный выигрыш в чувствительности анализа. Дополнительное время, требующееся на реализацию стадии усиления сигнала, было скомпенсировано за счет сокращения продолжительности других стадий анализа. В результате общее время ИХА в стандартном и усиленном форматах было сопоставимым: 18 и 17 мин, соответственно.

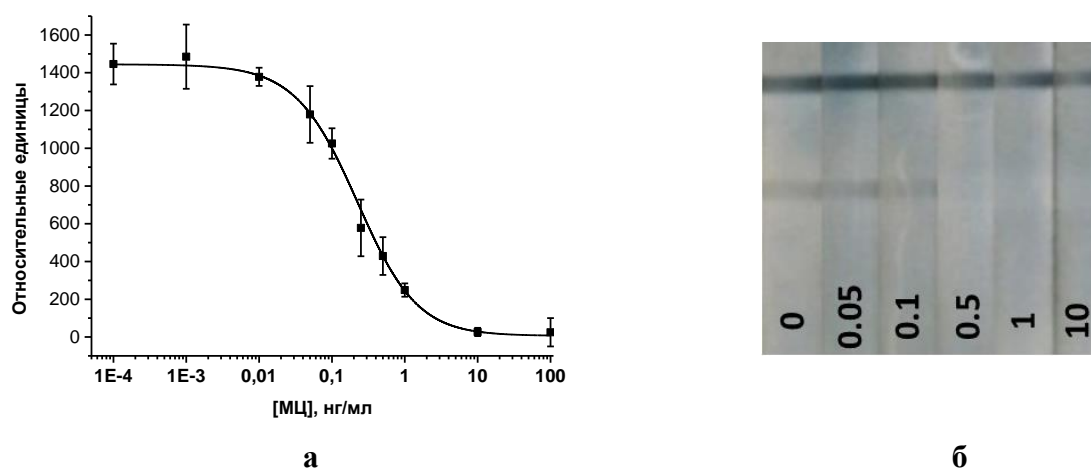


Рис. 3. Калибровочная кривая МЦ в ИХА с усилением серебром (а) и изображение тест-полосок (б). Цифрами на тест-полосках обозначены концентрации МЦ в пробах (нг/мл)

Разработанный усиленный ИХА был протестирован на пробах водопроводной, бутилированной и прудовой воды, загрязненных МЦ. Для всех проб показано исчезновение окрашенной линии в Т-зоне при концентрации МЦ 0.5 нг/мл, что соответствует визуальному ПрО. Это подтверждает возможность использования разработанной тест-системы для определения МЦ в пробах пресной воды.

3.4. ИХА микроцистина на основе магнитных частиц с пероксидазным усилением

ИХА с пероксидазным усилением сигнала был основан на оригинальном подходе, позволяющем значительно снизить ПрО МЦ без методического усложнения аналитической процедуры и увеличения ее продолжительности. Традиционно МЧ используются как твердый носитель для магнитной сепарации и концентрирования [24]. В данной работе МЧ применялись в качестве метки, альтернативной НЧЗ. Наличие на поверхности МЧ карбоксильных групп позволило осуществить ковалентное присоединение вторичных антител и фермента. Усиление колориметрического сигнала

МЧ, имеющих оранжевую окраску, реализовали с помощью ферментативной реакции ПХ. Такое сочетание (МЧ плюс пероксидазное усиление) позволило достичь ультрачувствительного определения МЦ в ИХА.

Размеры МЧ на 1–2 порядка превышают размеры НЧЗ. Поэтому для реализации ИХА была выбрана крупнопористая рабочая мембрана, что способствовало свободному движению метки с током жидкости. Кроме того, из мультимембранного композита исключили мембрану под пробу, которая блокировала движение реагентов, и использовали укороченные тест-полоски. На первом этапе реализовали ИХА с МЧ без иммобилизованной ПХ. Интенсивный оранжевый цвет МЧ позволил проводить колориметрическую детекцию без усиления. В оптимизированных условиях инструментальный и визуальный ПрО МЦ в стандартном ИХА составили 13 и 550 пг/мл, соответственно. Рабочий диапазон определяемых концентраций – 19–56 пг/мл, время анализа – 20 мин. При этом максимальная амплитуда сигнала составила ~2200 относительных единиц (ОЕ) (кривая 1 на рис. 4 а).

Для усиления колориметрического сигнала использовали МЧ с иммобилизованными АК и ПХ. В ходе реакции фермента с хромогенным субстратом образовывался окрашенный продукт, способствующий росту интенсивности окрашивания. В качестве субстрата был использован ДАБ. Аналитические характеристики стандартного и усиленного ИХА практически не отличались, однако максимальная амплитуда сигнала возросла примерно в 4 раза и составила ~9000 ОЕ. Это позволило варьировать условия анализа – снизить концентрации МАт и иммобилизованного на мембране белкового конъюгата МЦ – и благодаря этому значительно улучшить аналитические параметры тест-системы. Инструментальный и визуальный ПрО МЦ составили 2 и 50 пг/мл, соответственно (кривая 2 на рис. 4 а). Рабочий диапазон определяемых концентраций составил 33.7–3.7 пг/мл, время анализа – 20 мин. При этом максимальная амплитуда сигнала оставалась достаточно высокой (~7000 ОЕ). Таким образом, в результате пероксидазного усиления инструментальный ПрО МЦ был снижен в 6.5 раз, а визуальный – в 11 раз по сравнению со стандартным ИХА на основе МЧ. Вид тест-полосок после ИХА в стандартном и усиленном форматах представлен на рис. 4 б, в.

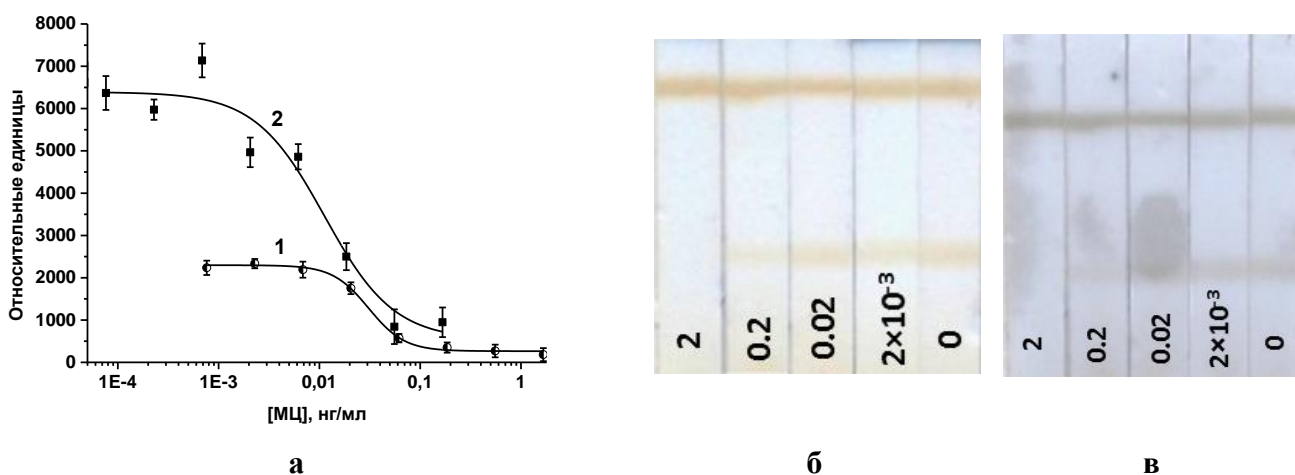


Рис. 4. Калибровочные кривые МЦ в стандартном ИХА на основе МЧ (1) и в формате с пероксидажным усилением сигнала (2) (а); изображение тест-полосок после ИХА без усиления (б) и после усиленного ИХА (в). Цифрами на тест-полосках обозначены концентрации МЦ (нг/мл)

Разработанная тест-система с пероксидажным усилением сигнала была апробирована для определения МЦ в контаминированных пробах морепродуктов (креветок, кальмаров, мидий, осьминогов). Степень выявления МС-LR варьировала в диапазоне 71–115%.

3.5. ИХА окадаевой кислоты на основе наночастиц золота с каскадным усилением

Предложенный метод каскадного усиления сигнала заключается в пропускании вдоль тест-полоски сначала раствора специфических МАТ в смеси с антиген-содержащей пробой, а затем нескольких циклов последовательного пропускания антивидовых антител, конъюгированных с НЧЗ и свободных антител, связывающихся с антивидовыми антителами, но не специфичных к целевому соединению. Результатом такого каскада взаимодействий является формирование агрегатов, имеющих структуру (АК–НЧЗ–АО) × n, где n – количество циклов пропускания АК–НЧЗ и АО. Количество циклов пропускания реагентов потенциально может быть любым, что исключает стехиометрические ограничения на количество маркеров, присоединяемых к одной иммобилизованной на мембране молекуле иммунореагента.

При каскадном усилении стадии специфического взаимодействия МАТ с ОК в пробе и введения в детектируемый комплекс окрашенной метки были разделены. Таким образом, в ходе первой реакции в аналитической зоне формируется комплекс МАТ – ОК–БСА. Для обеспечения возможности его детекции проводится вторая реакция: вдоль тест-полоски пропускается раствор АК–НЧЗ, связывание которого в Т-зоне приводит к появлению окрашенной линии. Отметим, что НЧЗ равномерно покрыты АК. Поэтому, если с одной стороны маркерной частицы произошло связывание со специфическим комплексом, то противоположная сторона остается свободной для других реакций. Поэтому можно осуществить дополнительные взаимодействия, увеличивающие включение маркера в иммунный комплекс. С этой целью вдоль тест-полоски пропускается раствор свободных антител (не специфичных к целевому маркеру, но связывающихся с антивидовыми антителами, которые уже включены в состав комплекса на мембране – АО), а для мечения образовавшегося при этом нового слоя иммуноглобулинов снова пропускается раствор АК–НЧЗ. Таким образом, в Т-зоне тест-полоски образуется сложная многослойная структура, в которой один комплекс антиген–антитело индуцирует связывание большого количества окрашенного золотого маркера.

В стандартном непрямом ИХА инструментальный и визуальный ПрО ОК составили 0.2 и 2 нг/мл, соответственно (кривая 1 на рис. 5 а). Рабочий диапазон определяемых концентраций составил 0.3–1.3 нг/мл, время анализа – 18 мин.

При выборе количества циклов амплификации в усиленном ИХА учитывалось два фактора. С одной стороны, рост чувствительности анализа достигается с увеличением количества реакций в каскаде (и, следовательно, интенсивности окрашивания в Т-зоне). С другой стороны, при возрастании численности стадий увеличивается общее время ИХА. Усиленный ИХА ОК сначала проводили в тех же условиях, что и стандартный ИХА (комплектация тест-полосок, концентрация иммунореагентов), реализуя 1–3 цикла усиления. При этом общее время ИХА варьировалось в диапазоне ~40–90 мин в зависимости от количества циклов амплификации. Такая продолжительность детекции противоречит основному принципу ИХА – экспрессности тестирования. Поэтому использовали укороченные тест-полоски (без мембраны под пробу), снизив объем реакционной среды в 5 раз. Это позволило сократить время ИХА до 29 мин (1 цикл амплификации) с увеличением на 14 мин для каждого последующего цикла. С точки зрения экспрессности было целесообразно проводить не более 2–3 циклов амплификации.

Увеличение интенсивности окрашивания Т-зоны в усиленном ИХА позволило снизить концентрацию специфических МАТ. При одном цикле усиления аналитический сигнал был низким, что отрицательно сказывалось на достоверности и точности ИХА. Поэтому данный вариант был исключен из сравнения и рассматривались только двух- и трехкаскадные форматы. Было показано, что при сопоставимых инструментальных ПрО ОК визуальный ПрО при 3 циклах усиления увеличивается, и общее время анализа составляет 57 мин. Поэтому был выбран ИХА ОК с 2 циклами усиления. В данных условиях инструментальный и визуальный ПрО ОК составили 30 пг/мл и 1 нг/мл (кривая 2 на рис. 5 а). Рабочий диапазон определяемых концентраций составил 0.07–0.85 нг/мл, время анализа – 43 мин. Изображения тест-полосок после стандартного и усиленного ИХА представлены на рис. 5 б, в. Таким образом, предложенный подход в усиленном ИХА позволил снизить ПрО ОК в 2–7 раз по сравнению со стандартным форматом.

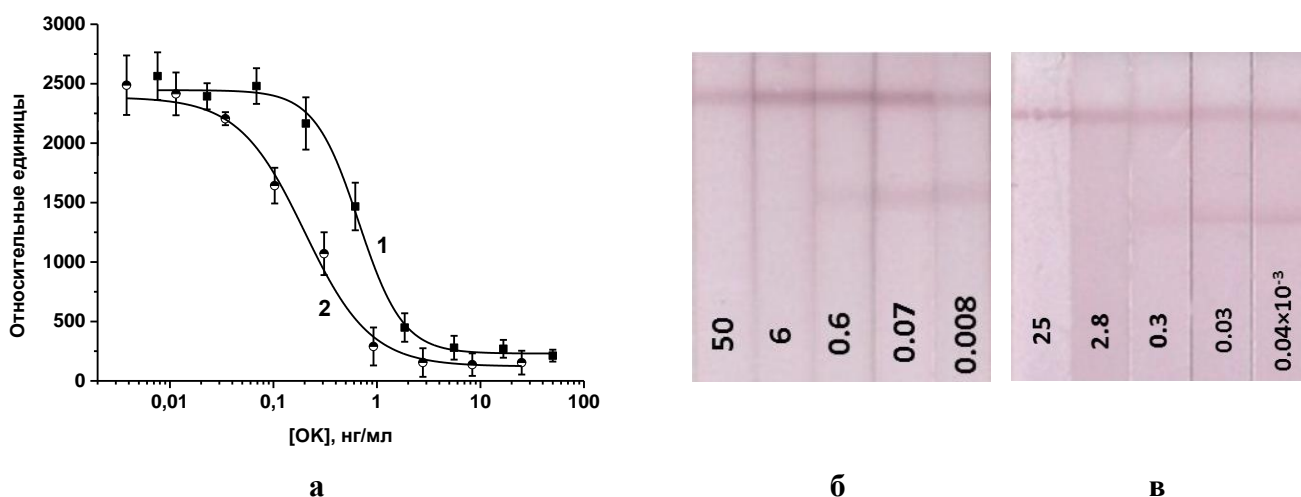


Рис. 5. Калибровочные кривые ОК в стандартном ИХА (1) и в формате ИХА с каскадным усилением сигнала (2) (а); изображение тест-полосок после ИХА без усиления (б) и после усиленного ИХА (в). Цифрами на тест-полосках обозначены концентрации ОК (нг/мл)

Усиленный ИХА применяли для обнаружения ОК в морской воде, рыбе (форели) и морепродуктах – креветках и гребешках. Степень выявления ОК составила 76.9–126%.

3.6. ИХА окадаевой кислоты на основе нанозима Au@Pt

Предлагаемый подход основан на применении нанозимов – наночастиц, имитирующих каталитическую активность различных ферментов [25]. В работе применялись биметаллические частицы из золотого ядра и платиновой оболочки (Au@Pt), обладающие пероксидазоподобной активностью [26]. Нанозим Au@Pt может быть использован в качестве как колориметрической (собственная черная окраска), так и каталитически активной метки. Снижение ПрО при использовании каталитических свойств нанозима основано на конверсии субстрата в детектируемый продукт. Амплификация сигнала достигается в результате формирования единичной частицей нанозима множества молекул регистрируемого продукта.

Непрямой ИХА на основе колориметрических свойств нанозимной метки методически сходен с ИХА на основе НЧЗ. В оптимизированных условиях инструментальный и визуальный ПрО ОК составили 1 и 50 нг/мл, а рабочий диапазон определяемых концентраций – 3.7–40.7 нг/мл (кривая 1 на рис. 6 а). Время тестирования составило 18 мин. Для реализации усиленного ИХА на основе каталитических свойств нанозима Au@Pt после формирования комплексов не мембране наносили субстрат пероксидазы ДАБ. Усиление окрашивания зон тест-полосок позволило в несколько раз снизить концентрацию специфических МАт. При этом интенсивность сигнала была выше, чем в стандартном ИХА (кривая 2 на рис. 6 а). Снижение концентрации МАт привело к повышению чувствительности определения ОК (кривая 2 на рис. 6 а); инструментальный и визуальный ПрО ОК в усиленном ИХА составили 0.6 и 25 нг/мл, соответственно, а рабочий диапазон определяемых концентраций – 1.4–24 нг/мл. Варьирование времени инкубации тест-полосок с ДАБ показало, что оптимальная продолжительность выдерживания тестов с субстратной смесью – 1 мин. Соответственно, общее время усиленного ИХА составило 19 мин. Таким образом, применение каталитически активной метки позволило снизить как инструментальный, так и визуальный ПрО ОК в 2 раза. Вид тест-полосок после стандартного и усиленного ИХА на основе нанозима представлен на рис. 6 б, в.

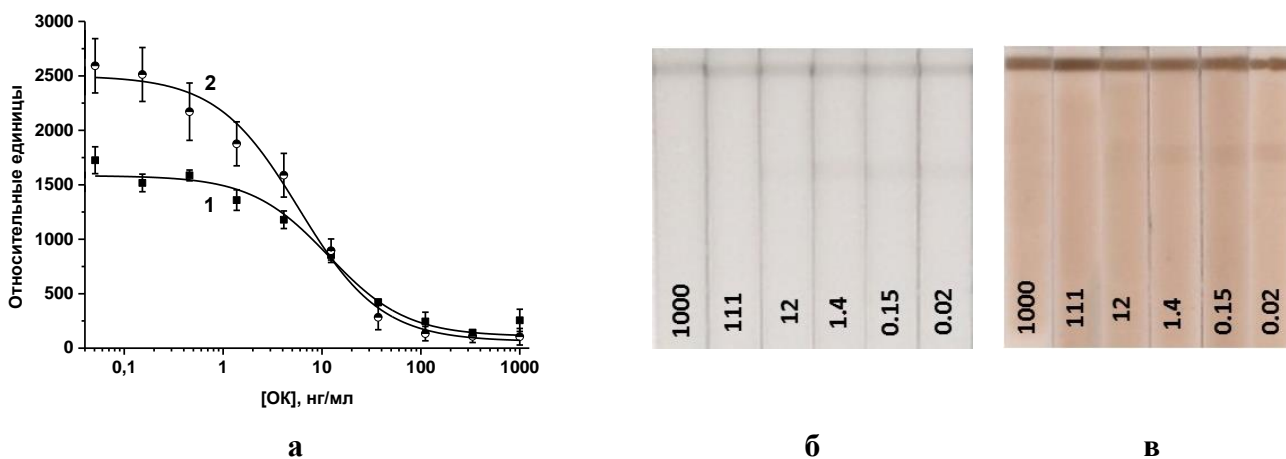


Рис. 6. Калибровочные кривые ОК в ИХА с нанозимом Au@Pt в стандартном формате (1) и в усиленном формате (2) (а); изображение тест-полосок после ИХА без усиления (б) и после усиленного ИХА (в). Цифрами на тест-полосках обозначены концентрации ОК (нг/мл)

Апробация усиленного ИХА показала возможность использования тест-системы для детекции ОК в контаминированных пробах морской и пресной воды и рыбы с сохранением высоких аналитических характеристик.

4. Выводы

В ходе проведенного исследования разработаны пять подходов, направленных на повышение чувствительности иммунохроматографического определения акватоксинов ОК и МЦ. Предложенные подходы основаны на варьировании свойств колориметрических маркеров и увеличении их количества в тестовых зонах. В результате достигнуто многократное снижение ПрО аналитов. Разработаны процедуры пробоподготовки пищевых и водных матриц. Показано успешное применение всех предложенных форматов усиленного ИХА для определения ОК и МЦ в воде, рыбе и морепродуктах. Универсальность предложенных подходов позволяет рекомендовать их для высокочувствительного обнаружения других пищевых и водных контаминантов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 20-43-07001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Current trends and new challenges in marine phycotoxins / M.C. Louzao, N. Vilariño, C. Vale, C. Costas, et al. // *Marine Drugs*. – 2022. – V. 20. – No 4. – Article 198.
2. L.M. Botana. Toxicological perspective on climate change: Aquatic toxins // *Chemical Research in Toxicology*. – 2016. – V. 29. – No 4. – P. 619-625.
3. Marine biotoxins: types of poisoning, underlying mechanisms of action and risk management programmes. Food safety assurance and veterinary public health / A.J. Murk, J. Nicolas, F.J.M. Smulders, C. Burk, et al. // *Chemical Hazards in Foods of Animal Origin*. – 2019. – V. 7. – P. 207-239.
4. Okadaic acid (OA): Toxicity, detection and detoxification / L.L. Fu, X.Y. Zhao, L.D. Ji, J. Xu // *Toxicon*. – 2019. – V. 160. – P. 1-7.
5. T. Arman, J.D. Clarke. Microcystin toxicokinetics, molecular toxicology, and pathophysiology in preclinical rodent models and humans // *Toxins*. – 2021. – V. 13. – No 8. – Article 537.
6. Технический Регламент Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю): утв. Решением Комиссии Таможенного Союза от 7 апреля 2011 г № 622. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2010. – 707 с.
7. Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain in feed and food // *EFSA Journal*. – 2009. – V. 1306. – P. 1-23.

8. Chemical diversity, origin, and analysis of phycotoxins / S.A. Rasmussen, A.J.C. Andersen, N.G. Andersen, K.F. Nielsen, et al. // *Journal of Natural Products*. – 2016. – V. 79. – No 3. – P. 662–673.
9. Current trends and challenges for rapid smart diagnostics at point-of-site testing for marine toxins / M.M. Dillon, M.A. Zaczek-Moczydlowska, C. Edwards, A.D. Turner, et al. // *Sensors*. – 2021. – V. 21. – Article 2499.
10. Recent advancements in structural improvements of lateral flow assays towards point-of-care testing / T. Mahmoudi, M. de la Guardia, B. Shirdel, A. Mokhtarzadeh, et al. // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – V. 116. – P. 13-30.
11. Methods for increasing sensitivity of immunochromatographic test systems with colorimetric detection (review) / V.G. Panferov, I.V. Safenkova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2021. – V. 57. – No 2. – P. 143-151.
12. Detection of okadaic acid (OA) using ELISA and colloidal gold immunoassay based on monoclonal antibody / R. Wang, L. Zeng, H. Yang, Y. Zhong, et al. // *Journal of Hazardous Materials*. – 2017. – V. 339. – P. 154-160.
13. G. Frens. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Natural Physical Science* – 1973. – V. 241. – P. 20-22.
14. Gold nanoparticles of different shape for bicolor lateral flow test / A.V. Petrakova, A.E. Urusov, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev // *Analytical Biochemistry*. – 2019. – V. 568. – P. 7–13.
15. The steadfast Au@Pt soldier: Peroxide-tolerant nanozyme for signal enhancement in lateral flow immunoassay of peroxidase-containing samples / V.G. Panferov, I.V. Safenkova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev // *Talanta*. – 2021. – V. 225. – Article 121961.
16. G.T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed.; Pierce Biotechnology; Thermo Fisher Scientific: Rockford, IL, USA, 2013. – 1200 p.
17. Highly sensitive immunochromatographic detection of antibiotic ciprofloxacin in milk / O.D. Hendrickson, E.A. Zvereva, I.A. Shanin, A.V. Zherdev, et al. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2018. – P. 54. – No 6. – P. 670-676.
18. J. Uhrovčík. Strategy for determination of LOD and LOQ values – some basic aspects // *Talanta*. – 2014. – V. 119. – P. 178-180.
19. Immunochromatographic tests for the detection of microcystin-LR toxin in water and fish samples / E.A. Zvereva, O.D. Hendrickson, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev // *Analytical Methods*. – 2020. – V. 12. – P. 392–400.
20. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of okadaic acid in shellfish sample / L. Hu, J. Liu, Q. Wang, Y. Zhang, et al. // *Journal of Applied Phycology*. – 2013. – V. 25. – P. 1091–1099.
21. "Multistage in one touch" design with a universal labelling conjugate for high-sensitive lateral flow immunoassays / A.E. Urusov, A.V. Petrakova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 86. – P. 575-579.
22. S. Eustis, M.A., Sayed. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes // *Chemical Society Reviews*. – 2006. – V. 35. – P. 209–217.
23. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review / X. Huang, Z.P. Aguilar, H. Xu, W. Lai, et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 75. – P. 166-180.
24. Recent advances in high-sensitivity detection methods for paper-based lateral-flow assay / V.-T. Nguyen, S. Song, S. Park, C. Joo // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2020. – V. 152. – Article 112015.
25. Nanozymes for medical biotechnology and its potential applications in biosensing and nanotherapeutics / S. Munir, A.A. Shah, H. Rahman, M. Bilal, et al. // *Biotechnology Letters*. – 2020. – V. 432. – No 3. – P. 357-373.
26. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II) / J. Wu, X. Wang, Q. Wang, Z. Lou, et al. // *Chemical Society Reviews*. – 2019. – V. 48. – P. 1004–1076.

DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR HIGHLY SENSITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DETECTION OF AQUATIC TOXINS

¹Hendrickson Olga Dmitrievna, Ph.D., Senior Researcher

²Zvereva Elena Anatol'evna, Ph.D., Senior Researcher

³Zherdev Anatoly Vitalievich, Ph.D., Leading Researcher

⁴Dzantiev Boris Borisovich, Doctor of Science, Prof., Head of Laboratory

^{1,2,3,4}Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: ¹odhendrick@gmail.com

Aquatic toxins are a group of toxins produced by certain types of algae and cyanobacteria and distributed through the food chains of water bodies. Potential contamination of aquaculture products with aquatic toxins requires the use of productive screening methods for prompt control of their safety. In this study, we propose immunochromatographic test systems for the detection of two aquatic toxins – phycotoxin okadaic acid (OA) and cyanotoxin microcystin-LR (MC-LR). The high sensitivity of the determination of OA and MC-LR is achieved through several approaches aimed at amplifying the analytical signal. The developed formats of immunochromatographic analysis (ICA) allow reducing the detection limits of aquatic toxins by 2–11 times. All modes of the enhanced ICA have been successfully tested for the detection of OA and MC-LR in seawater and freshwater as well as in fish and seafood samples.

УДК 631.873.3

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*

¹Дышлюк Любовь Сергеевна, д-р техн. наук, профессор кафедры пищевой биотехнологии

²Хильшер Мария Сергеевна, студентка

¹ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»,
Калининград, Россия, e-mail: lyubov.dyshlyuk@klgtu.ru

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»,
Кемерово, Россия, e-mail: mari.khilsher@mail.ru

*Исследование направлено на подбор рациональных параметров экстракционного извлечения пигментного комплекса из биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris*. В результате определения содержания хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, каротиноидов в экстрактах и антиоксидантной активности экстрактов микроводоросли по отношению к свободным радикалам 3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты установлено, что максимальное содержание хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах *Chlorella vulgaris* достигается при использовании в качестве экстрагента воды или 96% этанола, температуры 30 °С, гидромодуля 1:50, продолжительности процесса 0,5 ч.*

Микроводоросли являются одноклеточными фотосинтезирующими микроорганизмами. Они преобразуют солнечную энергию в биомассу с эффективностью, обычно превышающую таковую у наземных растений [1]. Годовое мировое производство микроводорослей по отраслям оценивается от 10 000 до 20 000 тонн для глобального рынка, между 0,5 и 5 млрд. евро в зависимости от многочисленных доступных источников в литературе [2]. Мировой рынок микроводорослей оценивается как зарождающийся, но с ежегодным приростом 10 %.

По разным оценкам, существует около 80 000 видов эукариотических микроводорослей, из которых идентифицированы только 50 000 видов. Микроводоросли остаются объектом интенсивных исследований во многих странах мира. Основные усилия сосредоточены на следующих ключевых направлениях:

- проведение скрининговых исследований с целью выявления потенциальных объектов промышленного выращивания и идентификации компонентов химического состава водорослей;
- исследование особенностей роста и метаболизма перспективных видов для определения их биологического потенциала и условий максимальной реализации;
- разработка управляемых систем культивирования и технологий переработки получаемого сырья, обеспечивающих высокую продуктивность и чистоту культур, минимизацию потерь БАВ при сборе и сушке биомассы и выделении их в чистом виде;
- биологические и клинические испытания терапевтической эффективности и безопасности продуктов из водорослей.

В последнее время микроводоросли рассматриваются уже не как запасной провиант на случай всемирного голода, а как ценнейший возобновляемый сырьевой ресурс для производства биологически активных веществ (каротиноидов, витаминов, ω -3,6 полиненасыщенных жирных кислот, фикобилипротеинов, полиглюканов, антибиотиков, цитостатиков, пептидов и др.), кормов для аквакультуры, животноводства и птицеводства, агрохимикатов (гербицидов, фунгицидов, удобрений, стимуляторов роста), энергоносителей (биодизеля, водорода, метана, этанола), пластмасс и других технических продуктов [3–7].

Особый интерес среди биологически активных веществ микроводорослей представляют вещества антиоксидантного действия, особенно каротиноиды: фукоксантин, астаксантин, виолаксантин, зеаксантин, сантаксантин, ауроксантин, неоксантин, β -криптоксантин, сапроксантин, лютеин, ликопин, β -каротин. В последнее время микроводоросли находятся в центре внимания среди других источников каротиноидов вследствие их многочисленных преимуществ: простые условия культивирования, быстрая воспроизводимость, экологическая устойчивость, способность к адаптации при изменении условий окружающей среды. Биосинтез каротиноидов в микроводорослях может индуцироваться либо модификацией условий культивирования, либо генно-инженерными методами [8].

Основными производимыми видами микроводорослей являются *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Bannochloropsis salina*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum* и *Haematococcus pluvialis*.

Хлорелла (*Chlorella vulgaris*) – представитель многочисленного семейства микроскопических водных растений. Сравнивая её с другими видами, хлореллу можно отнести к тем растениям, которые быстро приспособились к условиям аквакультуры. В 1 литре суспензии хлореллы содержится 5–6 г сырой биомассы хлореллы, в которой: 45–55 % белка, 5–10 % липидов, 35 % углеводов, до 10 % минеральных веществ. По качеству продуцируемого белка хлорелла превосходит все известные кормовые добавки и пищевые продукты: в ней содержатся все необходимые аминокислоты, в том числе незаменимые. По содержанию витаминов и минеральных веществ хлорелла превосходит все растительные корма и культуры сельскохозяйственного производства [9–13]. Еще одним очень важным компонентом хлореллы является хлорофилл, обладающий ценнейшим лечебно-профилактическим действием [11, 12, 14]. Количество его в расчете на сухое вещество достигает 4–6 %.

Значительная часть производимой в настоящее время хлореллы перерабатывается в нутрицевтики (сухой порошок, таблетки, экстракты), хотя первоначально её выращивали, главным образом, как кормовую добавку для аквакультуры, птицеводства и животноводства. Наиболее ценные вещества в химическом составе водоросли – β -1,3-глюкан (иммуностимулятор, регулятор липидного обмена), витамин В6 (>20 мкг·г⁻¹), биотин (до 2,5 мкг·г⁻¹), фолиевая (около 30 мкг·г⁻¹), пантотеновая (>100 мкг·г⁻¹) и аскорбиновая (15000 мкг·г⁻¹) кислоты, α -токоферол (2000 мкг·г⁻¹). Начиная с 70-х годов прошлого века в Японии, Корее и Китае БАД из хлореллы пользуются широкой популярностью и применяются для профилактики и лечения таких заболеваний как анемия, гастрит, гипертония, сахарный диабет, синдром усталости, в производстве лечебных шампуней, омолаживающих масок и кремов, средств для укрепления волос, лосьонов [15–16].

Преимущества использования микроводорослей для извлечения ценных продуктов очевидны: быстрая воспроизводимость, экологическая устойчивость, простота культивирования и способность адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Немаловажным является то,

что во многих случаях выход каротиноидов в биомассе микроводорослей намного выше, чем у морских бактерий, что делает использование микроводорослей более рентабельным вариантом для производства упомянутых биоактивных веществ в биотехнологическом масштабе. Дополнительно изменение условий выращивания и использование методов генной инженерии может также сыграть ключевую роль в увеличении продуктивности микроводорослей. С другой стороны, всегда следует учитывать еще одну особенность – антиоксидантную активность и другие свойства этих биологически активных соединений. Хотя они могут иметь одинаковую структуру и свойства, биоактивные соединения, полученные из микроводорослей, демонстрируют более высокий уровень биоактивности по сравнению с их аналогами, полученными из морских бактерий [17].

Учитывая вышеизложенное, перспективными являются исследования, направленные на экстракционное извлечение из биомассы микроводорослей комплекса веществ антиоксидантного действия с последующим использованием полученных экстрактов в производстве продуктов питания функционального назначения, БАД к пище, фармацевтических субстанций и косметических средств.

Объектом исследования являлся коммерческий штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris*, из биомассы которой получали пигментный комплекс путем водной и водно-этанольной экстракции. Предварительно проводили концентрирование биомассы микроводоросли путем центрифугирования при скорости вращения 3500 ± 10 об/мин в течение 6 мин. Далее провели дезинтеграцию клеточных стенок микроводоросли с целью повышения доступа растворителя во внутреннее пространство клетки. Для этого концентрат переносили в фарфоровую ступку и с помощью пестика осуществляли растирание биомассы.

Экстракцию пигментного комплекса из сухой биомассы *Chlorella vulgaris* проводили путем ступенчатой мацерации водой и 96 %-ным этиловым спиртом при температуре от $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и гидромодуле 1:50, выпаривание растворителя из полученного жидкого экстракта осуществляли при температуре $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

В полученных экстрактах определяли содержание пигментов (хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов) и антиоксидантную активность. Для количественного определения пигментов использовали спектрофотометрический метод и полосы поглощения в области 470, 649 и 664 нм. Расчет концентраций хлорофиллов и каротиноидов, содержащихся в биомассе тестируемых образцов, проводили по спектрам экстрактов в соответствии с формулами:

$$Ch_a = 13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{649}, \quad (1)$$

$$Ch_b = 27,43 \cdot A_{649} - 8,12 \cdot A_{664}, \quad (2)$$

$$C_k = (1000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot Ch_a - 97,63 \cdot Ch_b)/209, \quad (3)$$

где $Ch_{a,b}$ – концентрация хлорофиллов *a* и *b* в исследуемом экстракте, мкг/мл;

C_k – концентрация каротиноидов в исследуемом экстракте, мкг/мл;

$A_{470, 649, 664}$ – оптическая плотность исследуемого экстракта при длинах волн 470, 649 и 664 нм, соответственно [18].

Для измерения антиоксидантной активности экстрактов применяли спектрофотометрический метод, основанный на оценке способности потенциальных антиоксидантов улавливать свободные радикалы 3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS). Для получения исходного раствора ABTS+ 7 мМ раствор ABTS подвергали взаимодействию с 2,45 мМ персульфатом аммония (1:1). Смесь оставляли стоять в темноте в течение 16 ч при комнатной температуре. Рабочий раствор готовился разбавлением исходного раствора ABTS дистиллированной водой до получения оптической плотности 0,7 при длине волны 734 нм.

Для проведения эксперимента 1 мл экстракта смешивали с 3 мл рабочего раствора ABTS. После 10 мин инкубации при комнатной температуре измеряли оптическую плотность растворов. Контролем служил рабочий раствор ABTS без добавления экстракта. Активность по улавливанию радикалов для образцов выражали как процент улавливания радикала ABTS по формуле:

$$X = A_0 - A_1/A_0 \cdot 100, \quad (4)$$

где X – процент улавливания радикала ABTS, %;

A_0 – оптическая плотность контрольной пробирки;

A_1 – оптическая плотность образцов.

Для подбора рациональных параметров экстракции пигментного комплекса из биомассы *Ch. vulgaris* варьировали природу растворителя, температуру и продолжительность экстракции и измеряли концентрацию пигментов. Полученные результаты представлены в таблицах 1–3.

Таблица 1

Содержание хлорофилла *a* в экстрактах *Chlorella vulgaris* при разных температурах и продолжительности экстракции

Продолжительность экстракции, ч	Содержание хлорофилла <i>a</i> , мкг/мл, при разной температуре экстракции, °С		
	25	30	40
Экстрагент – 96 %-ный этиловый спирт			
0,5	3,048±0,010	3,802±0,012	3,647±0,041
1,0	3,277±0,011	3,231±0,073	3,797±0,014
2,0	1,474±0,050	2,152±0,024	3,376±0,012
Экстрагент – вода			
0,5	3,203±0,081	2,963±0,020	3,745±0,044
1,0	2,062±0,022	2,671±0,011	2,369±0,032
2,0	2,936±0,057	2,606±0,012	2,289±0,091

Согласно данным таблицы 1, максимальное значение концентрации хлорофилла *a* при спиртовой экстракции составило 3,802 мкг/мл при температуре экстракции 30 °С и продолжительности процесса 0,5 ч. При температуре экстракции 25 °С и продолжительности экстракции 2,0 ч содержание хлорофилла *a* в экстрактах минимально и составляет 1,474 мкг/мл.

Максимальное значение концентрации хлорофилла *a* при водной экстракции (3,745 мкг/мл) достигается при температуре экстракции 40 °С и продолжительности процесса 0,5 ч, минимальное (2,062 мкг/мл) – при температуре экстракции 25 °С и продолжительности экстракции 1,0 ч.

Таблица 2

Содержание хлорофилла *b* в экстрактах *Chlorella vulgaris* при разных температурах и продолжительности экстракции

Продолжительность экстракции, ч	Содержание хлорофилла <i>b</i> , мкг/мл, при разной температуре экстракции, °С		
	25	30	40
Экстрагент – 96 %-ный этиловый спирт			
0,5	1,765±0,015	1,840±0,032	1,910±0,040
1,0	1,989±0,011	1,920±0,022	1,989±0,014
2,0	1,022±0,051	1,314±0,021	1,468±0,032
Экстрагент – вода			
0,5	7,254±0,010	6,526±0,061	3,453±0,077
1,0	4,476±0,015	5,877±0,022	5,916±0,093
2,0	6,105±0,051	5,723±0,064	5,212±0,078

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что максимальное значение концентрации хлорофилла *b* при спиртовой экстракции составило 1,989 мкг/мл при продолжительности экстракции 1,0 ч и температуре экстракции 40 °С, минимальное (1,022 мкг/мл) – при температуре экстракции 25 °С и продолжительности процесса 2,0 ч. Максимальное значение концентрации хлорофилла *b* (7,254 мкг/мл) при водной экстракции зафиксировано при температуре 25 °С и продолжительности экстракции 0,5 ч, минимальное (3,453 мкг/мл) – при температуре 40 °С и продолжительности экстракции 0,5 ч.

Содержание каротиноидов в экстрактах *Chlorella vulgaris* при разных температурах и продолжительности экстракции

Продолжительность экстракции, ч	Содержание каротиноидов, мкг/мл, при разной температуре экстракции, °С		
	25	30	40
Экстрагент – 96 %-ный этиловый спирт			
0,5	0,963±0,051	1,216±0,025	1,195±0,012
1,0	0,932±0,011	0,936±0,042	1,152±0,014
2,0	0,426±0,036	0,627±0,072	0,964±0,026
Экстрагент – вода			
0,5	1,120±0,022	0,959±0,041	0,579±0,063
1,0	0,643±0,015	1,065±0,091	1,099±0,087
2,0	0,887±0,017	0,882±0,061	0,778±0,012

В результате установлено (таблица 3), что при спиртовой экстракции максимальная концентрация каротиноидов (1,216 мкг/мл) достигается при продолжительности экстракции 0,5 ч, температуре экстракции 30 °С, а минимальная (0,426 мкг/мл) – при продолжительности экстракции 2,0 ч и температуре процесса 25 °С. Водная экстракция является менее эффективной для извлечения каротиноидов. Максимальная концентрация каротиноидов при водной экстракции составила 1,120 мкг/мл при продолжительности экстракции 0,5 ч и температуре экстракции 25 °С, а минимальная (0,579 мкг/мл) – при продолжительности экстракции 0,5 ч и температуре экстракции 40 °С.

Для полученных экстрактов определяли антиоксидантную активность (рисунки 1–2). Рисунки 1 и 2 подтверждают, что все изучаемые экстракты микроводоросли *Chlorella vulgaris* проявляют антиоксидантные свойства. Максимальной антиоксидантной активностью характеризуются этанольные и водные экстракты, полученные при температуре 30 °С.

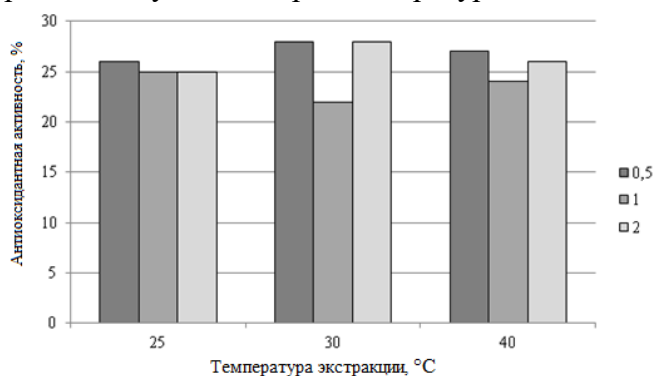


Рис. 1. Антиоксидантная активность спиртовых экстрактов *Chlorella vulgaris* при разных температурах и продолжительности процесса: 0,5, 1 и 2 ч

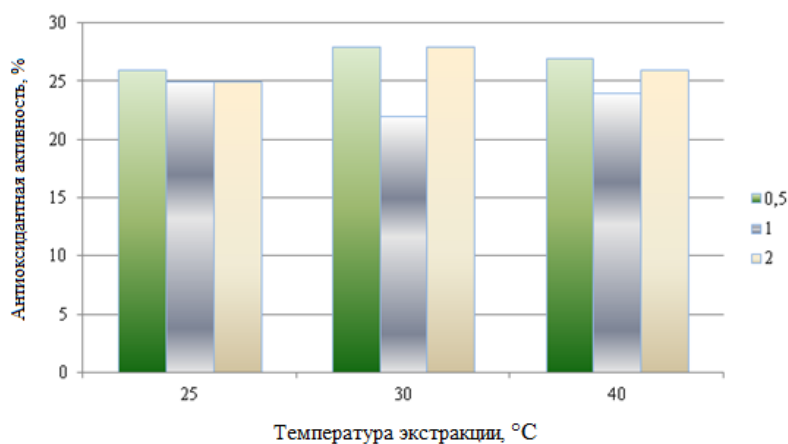


Рис. 2. Антиоксидантная активность водных экстрактов *Chlorella vulgaris* при разных температурах и продолжительности процесса: 0,5, 1 и 2 ч

Таким образом, обобщая полученные результаты по анализу содержания пигментов в экстрактах *Chlorella vulgaris* и наличию у них способности улавливать свободные радикалы 3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты, пришли к выводу, что для максимального извлечения из биомассы изучаемой микроводоросли хлорофилла *a* и каротиноидов предпочтительно использование 96 %-ного этанола и температуры 30 °С при продолжительности процесса 0,5 ч. В то же время хлорофилл *b* наиболее эффективно экстрагируется водой при температуре 25–30 °С в течение 0,5 ч. При этом высокая антиоксидантная активность продемонстрирована как для этанольных, так и для водных экстрактов, полученных при 30 °С в течение 0,5 ч. На основании вышеизложенного в качестве рациональных параметров извлечения пигментного комплекса, проявляющего антиоксидантные свойства, из биомассы *Chlorella vulgaris* выбраны: экстрагент – вода или 96 %-ный этиловый спирт, температура 30 °С, продолжительность процесса 0,5 ч.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение антимикробных свойств экстрактов, а также на выделение из полученных экстрактов индивидуальных БАВ антиоксидантного действия и установление их химической структуры и свойств. Экстракты и индивидуальные биологически активные вещества, выделенные из них, будут востребованы производителями функциональных продуктов питания, биологически активных добавок к пище, фармацевтических препаратов и косметических средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution / P.G. Stephenson, C.M. Moore, M.J. Terry, et al. // Trends Biotechnol. – 2011. – № 29. – P. 615–623.
2. Guedes A.C., Amaro H.M., Malcata F.X. Microalgae as source of high-value compounds – a brief review of recent works // Biotechnol. Prog. – 2011. – № 27. – P. 597–613.
3. Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply / S. Aikawa, Y. Izumi, F. Matsuda, et al. // Bioresour. Technol. – 2012. – № 108. – P. 211–215.
4. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // Renewable Sustainable Energy Rev. – 2010. – № 14 (2). – P. 557–577.
5. Christenson L., Sims R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts // Biotechnol. Adv. – 2011. – № 29. – P. 686–702.
6. Karemore A., Sen R. Downstream processing of microalgal feedstock for lipid and carbohydrate in a biorefinery concept: a holistic approach for biofuel applications // RSC Adv. – 2016. – № 6 (35). – P. 29486–29496.
7. A techno-economic assessment of an algal-based biorefiner / G. Thomassen, U.E. Vila, M.V. Dael, et al. // Clean Technol. Environ. Policy. – 2016. – P. 1–14.
8. Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms / J. Torregrosa-Crespo, Z. Montero, J. Fuentes, et al. // Mar. Drugs. – 2018. – V. 16. – P. 203.
9. Synergistic effect of multiple stress conditions for improving microalgal lipid production / H.S. Kwak, J.Y.H. Kim, H.M. Woo, et al. // Algal Res. – 2016. – № 19. – P. 215–224.
10. Evaluation of antiangiogenic and antiproliferative potential of the organic extract of green algae *Chlorella pyrenoidosa* / M. Kyadari, T. Fatma, R. Azad, et al. // Indian J. Pharmacol. – 2013. – № 45 (6). – P. 569.
11. Quinn J.C., Davis R. The potentials and challenges of algae based biofuels: a review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling // Bioresour. Technol. – 2015. – № 184. – P. 444–452.
12. Microalgae to biofuels lifecycle assessment – multiple pathway evaluation / J.C. Quinn, T.G. Smith, C.M. Downes, et al. // Algal Res. – 2014. – № 4. – P. 116–122.
13. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities / S.M. Shanab, S.S. Mostafa, E.A. Shalaby, et al. // Asian Pac. J. Tropical Biomed. – 2012. – № 2 (8). – P. 608–615.
14. Yen H.-W., Yang S.-C., Chen C.-H. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass // Bioresour. Technol. – 2015. – № 184. – P. 291–296.

15. Extraction, purification and concentration of partially saturated canthaxanthin from *Aspergillus carbonarius* / D. Krupa, E. Nakkeeran, N. Kumaresan, et al. // Bioresour. Technol. – 2010. – № 101 (19). – P. 7598-7604.
16. From microalgae oil to produce novel structured triacylglycerols enriched with unsaturated fatty acids / J. Wang, X.-D. Wang, X.-Y. Zhao, et al. // Bioresour. Technol. – 2015. – № 184. – P. 405-414.
17. Marine bacteria versus microalgae: who is the best for biotechnological production of bioactive compounds with antioxidant properties and other biological applications? / M. Hamidi, P.S. Kozani, G. Pierre, et al. // Mar. Drugs. – 2020. – V. 18. – P. 28.
18. Pre-treatment and extraction techniques for recovery of added value compounds from wastes throughout the agri-food chain / T.M Attard, R.M Lukasik, A.M daCostaLopes, et al. // GreenChem. – 2016. – № 18 – P. 160–204.

THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS* EXTRACTS

¹Dyshlyuk Lyubov Sergeevna, dr. tech. sciences, professor of the Department of Food Biotechnology

²Hilsher Maria Sergeevna, student

¹Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia, e-mail: lyubov.dyshlyuk@klgtu.ru

²Kemerovo State University, Kemerovo, Russia, e-mail: mari.khilsher@mail.ru

*The study is aimed at selecting rational parameters for the extraction of the pigment complex from the biomass of the microalgae *Chlorella vulgaris*. As a result of determining the content of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids in extracts and the antioxidant activity of microalgae extracts in relation to free radicals of 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, it was found that the maximum content of chlorophylls and carotenoids in *Chlorella vulgaris* extracts is achieved when using as an extractant of water or 96% ethanol, temperature 30 °C, hydromodule 1:50, process duration 0.5 h.*

УДК 665.939.358:579.873.13

ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ НА БИОГЕЛЕ ИЗ САХАРИНЫ *SACCHARINA JAPONICA*

Журавлева Ольга Викторовна, аспирант

Аспирантура Тихоокеанского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ТИНРО»), Владивосток, Россия, e-mail: roma_rosi@mail.ru

*Для определения продукта с потенциальными пребиотическими свойствами исследована возможность культивирования бифидобактерий вида *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum* на биогеле из сахарины японской. Показано, что культивирование в течение 8 часов сопровождается сохранением числа бифидобактерий в продукте. Дополнительное введение при культивировании гидролизата молочной сыворотки позволяет существенно увеличить количество бифидобактерий в готовом продукте. Изучены параметры внесения гидролизата молочной сыворотки в биогель. Получены образцы готовой продукции, определены их органолептические характеристики.*

Введение

Частью комплексного, целостного подхода к здоровому образу жизни стало улучшение здоровья человека путем модуляции микробиома [1]. Обеспечение баланса в богатых, разнообразных микробных экосистемах, населяющих слизистые и кожные поверхности, является одним из способов не только поддерживать или улучшать здоровье, но и лечить заболевания. Изменение состава и метаболических признаков этих микробных популяций возможна с помощью веществ, обладающих пребиотическими свойствами [2; 3; 4]. Пребиотики должны усваиваться микроорганизмами, положительно влияющими на здоровье, то есть пробиотическими бактериями. В настоящее время одними из самых распространенных пробиотических микроорганизмов являются бифидобактерии. Даже несмотря на то, что по последним данным молекулярного анализа большая часть микробиоты кишечника взрослого человека состоит из представителей типов *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, роль бифидобактерий в экологии кишечника нельзя недооценивать [5]. Отмечается, что сложные взаимодействия между человеком и бифидобактериями играют ключевую роль в поддержании здоровья и предотвращении болезней [6]. Соответственно большинство исследований по определению пребиотического потенциала все так же сосредоточены на положительных эффектах, оказываемых на бифидобактерии.

В наших исследованиях было продемонстрировано, что как альгинат натрия, так и его гидролизаты могут проявлять потенциальные пребиотические свойства, о чем свидетельствует увеличение некоторых видов ферментативной активности у бифидобактерий [7; 8]. При этом альгинатные гидролизаты вызывали более значимые увеличения активности. Так, добавление альгината натрия в культуральную среду увеличивало α -глюкозидазную активность бифидобактерий более, чем в 2 раза, добавление альгинатного гидролизата в свою очередь вело к увеличению α -глюкозидазной активности более, чем в 3 раза. Наши данные согласуются с результатами, полученными рядом авторов [9; 10] при исследовании альгинатов и их производных, а также с данными по изучению пребиотического потенциала наземного сырья. Как правило, снижение молекулярной массы полисахарида вело к увеличению его пребиотического потенциала. Тем не менее, некоторые исследователи не наблюдали взаимосвязи пребиотического потенциала с молекулярной массой альгинатов [11]. Стоит отметить, что в последнем случае был использован метод фекальной ферментации *in vitro*. Возможно, расхождение в мнениях связано с типом микробиоты у доноров, предоставивших образцы фекалий в этом исследовании. Как было продемонстрировано в одной из последних работ, микробиота кишечника человека может оказывать энтеротип-специфическое влияние на результаты ферментации олигосахаридов морских водорослей [12].

Следующим этапом наших работ стала проверка возможности бифидобактерий расти на чистом водорослевом сырье, что позволит перейти к разработке технологической схемы производства продукции. Поскольку ферментативная активность гидролизатов альгината была выше, чем у исходных альгинатов, то было принято решение провести культивирование на биогеле «Ламиналь» (далее – биогель), произведенном по технологии комплексной переработки сахарины японской (*Saccharina japonica*). Технология производства этого продукта предусматривает превращение структурных полисахаридов морской водоросли сахарины (ламинарии) в водорастворимые биополимеры. Кроме того, многочисленными исследованиями было показано, что биогель положительно влияет на здоровье человека [13]. Биогель был использован в технологии кисломолочных продуктов, при этом обеспечивалось высокое содержание и жизнеспособность бифидобактерий [14]. Внесение экзометаболитов бифидобактерий влияло на структурно-механические свойства биогеля – было установлено, что метаболиты бифидобактерий способствуют деградации альгиновых кислот [15]. Тем не менее, данных о культивировании бифидобактерий в чистом биогеле на данный момент не было.

Нами было исследовано культивирование бифидобактерий на чистом биогеле, а также изучено влияние гидролизата молочной сыворотки (далее – ГМС) на рост бифидобактерий в среде биогеля.

Объекты и методы исследования

Рост бифидобактерий на чистом биогееле

Схема эксперимента включала следующие стадии: получение биогееля, включая стадию пастеризации; охлаждение до температуры культивирования; внесение закваски бифидобактерий; культивирование при температуре 37 °С; оценка изменения количества бифидобактерий в начале и по окончании процесса культивирования.

Ранее в экспериментах по определению ферментативной активности нами была использована сухая закваска бифидобактерий В-3 видовой принадлежности *B. Adolescentis* производства АО «Вектор-БиАльгам». При этом требовалась предварительная активация закваски в течение 24 ч. Переход к разработке технологии производства продукта предусматривает выбор рациональных способов ведения процесса на предприятии. Как правило, в современном производстве предварительная активация закваски не является рациональной, поэтому было принято решение использовать живую закваску бифидобактерий.

В качестве живой закваски был выбран «Бифидум БАГ» жидкий концентрат бифидобактерий видовой принадлежности *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum*, также производства АО «Вектор-БиАльгам». Эти виды бифидобактерий обладают схожим с *B. Adolescentis* набором углеводмодифицирующих ферментов [16], кроме того они являются коммерчески доступными.

Для проведения эксперимента в предварительно обработанный термостат загружали биогель, в который инокулировали «Бифидум БАГ». Культивирование проводили в течение 8 часов. Для определения количества бифидобактерий отбирали пробы продукта через 1 час после начала культивирования и по завершении процесса, т.е. через 8 часов.

Количество бифидобактерий определяли методом предельных (исчерпывающих) концентраций [17].

Влияние ГМС на рост бифидобактерий в среде биогееля

При исследовании влияния ГМС на рост бифидобактерий в качестве положительного контроля использовали бифидум-среду, дополнительно изучали влияние вносимого в бифидум среду ГМС. Рост бифидобактерий на чистом биогееле сравнивали с ростом бифидобактерий на биогееле с ГМС.

Параллельно в термостат помещали 4 предварительно стерилизованных образца:

- биогель;
- биогель + ГМС;
- бифидум среда (положительный контроль);
- бифидум среда + ГМС (положительный контроль).

Образцы засеивали бифидобактериями («Бифидум БАГ»). Культивирование проводили в течение 24 часов. Увеличение времени культивирования было связано с тем, что используемый в этих экспериментах биогель имел более высокую густоту. Поскольку установлено, что от густоты биогееля зависит скорость деструкции полимеров [15], то время проведения эксперимента было увеличено.

Через час после начала культивирования и по окончании культивирования из каждого образца отбирали пробы для оценки количества ББ [17].

Выбор рациональной концентрации ГМС для введения в биогель

В серии экспериментов были установлены оптимальные концентрации раствора гидролизата для введения в биогель. Для этого готовили растворы гидролизата с концентрацией от 5 до 20%. Смешивали растворы с биогеелем таким образом, чтобы количество вносимого ГМС составляло 3,5 % от массы биогееля. Оценивали полученную консистенцию. При этом учитывали несколько факторов: итоговая консистенция должна обеспечивать возможность равномерного перемешивания продукта и последующего роста бифидобактерий. При этом слишком жидкая консистенция также являлась нежелательной, так как во время культивирования происходит разжижение среды, при этом чем сильнее разбавлена среда, тем быстрее может происходить деструкция.

Результаты и обсуждение

Рост бифидобактерий на чистом биогееле

Целью эксперимента было выяснить, способны ли бифидобактерии определенное время культивироваться в среде, содержащей только водоросли/продукты их переработки.

Культивирование бифидобактерий в течение 8 часов на биогеле показало, что количество бифидобактерий в начале и по окончании культивирования было примерно одинаково и составляло от 4 до $7 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г. Это может свидетельствовать о том, что бифидобактерии способны расти на чистом биогеле, то есть усваивать компоненты биогеля как основной источник питания. Однако увеличения количества бифидобактерий при культивировании не происходило. Этот результат нельзя назвать отрицательным. Совместное инкубирование биогеля в течение 8 часов позволило получить продукт, обогащенный не только бифидобактериями, но и их метаболитами. Как известно, бифидобактерии в процессе своей жизнедеятельности могут производить антимикробные агенты, такие как различные кислоты (например молочную, уксусную) или бактериоцины, которые противодействуют колонизации патогенных микроорганизмов [16; 18].

Значительного изменения вязкости при культивировании не произошло. Это может быть связано с тем, что количество бифидобактерий не увеличивалось, соответственно была использована лишь небольшая часть субстрата для поддержания жизнедеятельности.

Образцы продукта расфасовали, заморозили и хранили при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. По истечении 30 дней проверили соответствие органолептических показателей. Органолептическую оценку при сравнении образцов продукции проводили в соответствии с требованиями [19], используя тест парного сравнения. Изменений не было выявлено. Последующие испытания через 3 и 6 месяцев хранения показали, что органолептические показатели полученного продукта не изменились. Отсутствие разницы во вкусе с исходным биогелем можно отметить как положительный момент, так как полученный продукт, обогащенный бифидобактериями, может быть хорошо принят потребителями, знакомыми с биогелем Ламиналь.

Влияние ГМС на рост бифидобактерий в среде биогеля

Несмотря на то, что бифидобактерии показали способность выживать при культивировании на чистом биогеле, было предложено улучшить выживаемость бифидобактерий, введя дополнительный фактор роста. Так, оптимально сбалансированная для роста бифидобактерий питательная среда содержит в 1 л готовой среды 30 г гидролизата казеина (т.е. $\sim 3\%$), а также 5 г экстракта дрожжей (0,5 %). Основными компонентами дрожжевого экстракта являются продукты распада белков (пептиды, свободные аминокислоты) и нуклеотиды, т.е. он также относится к белковой части. Соответственно, общее содержание белковых веществ в бифидум-среде составляет около 3,5%.

Для улучшения роста и выживаемости бифидобактерий в биогель было предложено ввести ГМС. Сравнивали количество бифидобактерий в четырех образцах: в бифидум-среде и в бифидум-среде с ГМС (положительный контроль), в биогеле и в биогеле с ГМС.

Количество бифидобактерий в биогеле как через час после начала, так и по окончании культивирования составило $\approx 1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Стоит отметить, что количество бифидобактерий было практически на 2 порядка ниже, чем в аналогичных экспериментах с биогелем, проведенных ранее (от 4 до $7 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл), что связано, по-видимому, с консистенцией использованного биогеля. Ранее было показано, что от густоты биогеля напрямую зависела скорость деструкции полимеров при обработке биогеля метаболитами бифидобактерий [15]. Соответственно, при разработке параметров технологического процесса, этому фактору необходимо уделить отдельное внимание.

Количество бифидобактерий в биогеле с ГМС через час после начала культивирования составило $\approx 1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, по окончании – $\approx 2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, что на порядок выше, чем в чистом биогеле. Результаты свидетельствуют, что культивирование на среде, дополненной ГМС, привело к увеличению количества бифидобактерий. Это подтвердило предположение о том, что введение дополнительных факторов роста, в частности ГМС, способствует увеличению количества бифидобактерий.

Положительным контролем в данном эксперименте являлась бифидум-среда и бифидум-среда, дополненная ГМС. Как в бифидум-среде, так и в бифидум-среде с ГМС количество бифидобактерий превысило $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Этот факт легко объясняется тем, что бифидум-среда оптимально сбалансирована для выращивания бифидобактерий. Дополнительно добавление ГМС не вызвало ухудшения роста бифидобактерий.

Выбор рациональной концентрации ГМС для введения в биогель

При смешении биогеля и ГМС в виде порошка вязкость биогеля резко увеличивалась. Кроме того, пастеризация сырья при использовании порошка ГМС вызывала ряд вопросов. Соответственно, было предложено введение ГМС в биогель в виде раствора. Наилучшие результаты были

получены при использовании раствора ГМС с концентрацией 10 %. Было выбрано следующее соотношение: на 1 кг биогеля необходимо вводить 350 г 10%-ного раствора гидролизата. При этом обеспечивается возможность отдельной пастеризации как биогеля, так и раствора ГМС, что предотвращает контаминацию продукта болезнетворными микроорганизмами.

Отдельно стоит обратить внимание на выбор ГМС, применению которых в настоящее время посвящено большое количество работ [20-24]. Использование ГМС с различной термостабильностью позволяет изменять существующую схему. При работе с термостабильными ГМС возможно введение раствора ГМС непосредственно в биогель и проведение последующей совместной пастеризации. Интерес также может представлять использование ГМС с различными вкусо-ароматическими свойствами.

Обобщая вышеизложенное, можно сделать несколько выводов:

- бифидобактерии способны определенное время культивироваться на биогеле из водорослей;
- введение ГМС в биогель из водорослей усиливает рост бифидобактерий;

- наиболее рациональным является введение на 1 кг биогеля 350 г 10%-ного раствора ГМС, что при использовании ГМС с различной термостабильностью позволяет выбрать оптимальные режимы пастеризации (раздельная или совместная).

Таким образом, нами был получен образец продукта, обогащенный бифидобактериями и их метаболитами, о чем свидетельствует наличие в готовом продукте бифидобактерий, количество которых на порядок превышает исходные значения. Поскольку полученный продукт предлагается хранить аналогично исходному биогелю (заморозка), то стоит отметить некоторые преимущества полученного продукта.

С одной стороны, замораживание и хранение в замороженном виде способствуют медленному отмиранию клеток пробиотических микроорганизмов, что обуславливает время хранения готовой продукции. Однако применение пребиотиков и гидролизата сывороточных белков стимулирует рост полезных микроорганизмов [25]. Соответственно, следует ожидать, что при размораживании полученного продукта часть бифидобактерий останется жизнеспособной, то есть полученный продукт можно будет называть продуктом, обогащенным бифидобактериями.

При этом в последнее время в научной литературе и в коммерческих продуктах все чаще стал использоваться термин «постбиотики». В 2019 году Международной научной ассоциацией пробиотиков и пребиотиков (ISAPP) термин «постбиотики» был определен как «препарат из неодоушевленных микроорганизмов и/или их компонентов, приносящий пользу для здоровья хозяина» [26]. Эффективные постбиотики могут содержать инактивированные микробные клетки или клеточные компоненты с метаболитами или без них, которые способствуют наблюдаемой пользе для здоровья. Многие существующие постбиотики включают неодоушевленные штаммы, принадлежащие к установленным таксонам пробиотиков в пределах некоторых родов семейства *Lactobacillaceae* или рода *Bifidobacterium* [27; 28]. То есть наличие даже нежизнеспособных пробиотических микроорганизмов также может приносить пользу для здоровья.

Таким образом, полученный продукт в результате размораживания может оставаться не только продуктом, обогащенным бифидобактериями, но и в случае гибели микроорганизмов – являться потенциальным постбиотиком из-за содержания в нем клеток рода *Bifidobacterium*. Тем не менее, для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования и наличие установленных критериев присвоения постбиотического статуса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prescott, S. L. Biodiversity, the human microbiome and mental health: moving toward a new clinical ecology for the 21st Century? / S. L. Prescott, A. C. Logan, R. A. Millstein, M. A. Katszman // Int. J. Biodiversity. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-18.
2. Gibson, G.R. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics / G.R. Gibson, R. Hutkins, M.E. Sanders et al. // Nature reviews: Gastroenterology & Hepatology. – 2017. – P. 491–502.
3. David, L. A. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome / L. A. David et al. // Nature. – 2014. – Vol. 505. – P. 559-563.

4. Cani, P. D. Talking microbes: when gut bacteria interact with diet and host organs / P. D. Cani, A. Everard // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2016. – Vol. 60. – P. 58–66.
5. Turrone, F. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality / F. Turrone et al. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2008. – Vol. 94. – P. 35–50.
6. Esteban-Torres M. Editorial: Role of Bifidobacteria in Human and Animal Health and Biotechnological Applications / M. Esteban-Torres, L. Ruiz, G.A. Lugli, M. Ventura, A. Margolles, D. van Sinderen // *Frontiers in Microbiology.* – 2021. – Vol. 12. – P. 1-3.
7. Журавлева, О.В. Исследование влияния альгината натрия на ферментативную активность пробиотических бактерий / О.В. Журавлева // *Инновационное развитие рыбной отрасли в контексте обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации: Материалы II Национальной научно-технической конференции.* – Владивосток, 2018 г. – С. 128–133.
8. Журавлева, О.В. Исследование пребиотического потенциала альгината натрия и продуктов его гидролиза / О.В. Журавлева // «Пищевая и морская биотехнология»: мат-лы IX Международной научно-практической конференции VIII Международного «Балтийского морского форума», 5 октября 2020 г. – г. Калининград, КГТУ, 2020. – С. 40-46.
9. Li, M. In vitro fermentation of alginate and its derivatives by human gut microbiota / M. Li, G. Li, Q. Shang et al. // *Anaerobe.* – 2016. – Vol. 39. – P. 19–25.
10. Wang, Y. In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate / Y. Wang, F. Han, B. Hu et al. // *Nutrition Research.* – 2006. – Vol. 26. – P. 597– 603
11. Ramnani, P. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds / P. Ramnani et al. // *Anaerobe.* – 2012. – Vol. 18. - P. 1-6.
12. Fu T. Enterotype-Specific Effect of Human Gut Microbiota on the Fermentation of Marine Algae Oligosaccharides: A Preliminary Proof-of-Concept *in vitro* Study / T. Fu, L. Zhou, Z. Fu et al. // *Polymers (Basel).* – 2022. – Vol. 14. – P.770-778.
13. Аминина Н.М. Лечебно-профилактический продукт «Ламиналь - Биогель из морских водорослей». - Владивосток: ТИНРО-Центр, 2006. – 34 с.
14. Конева, Е.Л. Обоснование и разработка технологий альгинатсодержащих функциональных продуктов: дис. ... канд. техн. наук. – Владивосток, 2009. – 150 с.
15. Якуш Е.В. Новые аспекты применения альгинатсодержащего биогеля из бурых водорослей в технологии пребиотиков / Е.В. Якуш, Е.Л. Конева, Н.М. Аминина и др. // *Известия ТИНРО.* – 2017. – Т. 190. – С. 204-211.
16. Pokusaeva, K. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria / K. Pokusaeva, G. F. Fitzgerald, D. Van Sinderen // *Genes Nutr.* – 2011. – Vol. 6. – P. 285–306.
17. ГОСТ Р 56139-2014 Продукты пищевые функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов. Введ. 01.01.2016. – М.: Стандартинформ, 2015.
18. Turrone, F. Bifidobacteria: from ecology to genomics / F. Turrone, D. van Sinderen, M. Ventura // *Frontiers in Bioscience.* – 2009. – Vol. 14. - P. 4673-4684.
19. ГОСТ ISO 6658-2016 Органолептическим анализ. Методология. Общее руководство. Введ. 01.07.2017. – М.: Стандартинформ, 2016.
20. Паладий И.В. Молочная сыворотка: обзор работ. Часть 1. Классификация, состав, свойства, производные, применение / И. В. Паладий, Е. Г. Врабие, К. Г. Спринчан, М. К. Болога // *Электронная обработка материалов.* – 2021. – Т. 57. – С. 52–69.
21. Донская Г. А. Напитки кисломолочные с повышенным содержанием сывороточных белков и водорастворимых антиоксидантов / Г. А. Донская, В. М. Дрожжин, В. В. Брызгалина // *Вестник МГТУ.* – 2018. – Т. 21. – № 3. – С. 471–480.
22. Токаев Э.С. Современный опыт и перспективы использования препаратов сывороточных белков в производстве функциональных напитков / Э.С. Токаев, Е.Н. Баженова, Р.Ю. Мироедов // *Молочная промышленность.* – 2007. - №10. – С.55-56.
23. Просеков А.Ю. Получение ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с использованием протеолитических ферментов / А.Ю. Просеков, Е.В. Ульрих, С.Ю. Носкова, В.Г. Будрик, С.Г. Ботина, Е.Ю. Агаркова Е.Ю., Е.И. Мельникова // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – № 6-5. – С. 1089-1093.
24. Способ получения гидролизата белка молочной сыворотки: пат. 2084172 С1 РФ, МПК А23L1/325 / Пер Мюнк Нильсон, Свенн Эриксен, Оле Регнар Хансен (Дания); Данмарк Протеин

А/С (Дания). - № 93058581/13; заявл. 27.05.1992; опубл. 20.07.1997; приоритет 31.05.1991 EP 91610049.8. – 11 с.

25. Медведева, Т.А. Исследование влияния пребиотиков на морфологическую картину при микроскопировании кисломолочных продуктов / Т.А. Медведева, А.В. Ландиховская // сб. научных статей по итогам Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (22– 23 марта 2019 г., г. Коломна) / под ред. А.Н. Столяровой. – Коломна: Государственный социальнoгуманитарный университет, 2019. – с. 152 – 156.

26. Salminen S. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics / S. Salminen, M.C. Collado, A. Endo *et al.* // Nature reviews. Gastroenterology & hepatology. – 2021. – Vol. 18. – P. 649-667.

27. Patel, R. M. Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? / R.M. Patel, P.W. Denning // Clin. Perinatol. – 2013. – Vol. 40. – P. 11–25.

28. Andresen, V. Heatinactivated *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (SYN- HI-001) in the treatment of irritable bowel syndrome: a multicentre, randomised, double- blind, placebo- controlled clinical trial / V. Andresen, J. Gschossmann, P. Layer // Lancet Gastroenterol. Hepatol. – 2020. – Vol. 5. – P. 658–666.

STUDY OF THE CULTIVATION OF BIFIDOBACTERIA ON BIOGEL FROM THE ALGAE SACCHARINA JAPONICA

Zhuravleva Olga Viktorovna, graduate student, leading specialist of the laboratory of safety and quality of marine plant raw materials

Postgraduate school, Pacific branch of VNIRO ("TINRO"),
Vladivostok, Russia, e-mail: roma_rosi@mail.ru

*To determine a product with potential prebiotic properties, the possibility of cultivating bifidobacteria of the species *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* on biogel from Japanese saccharin was studied. It is shown that cultivation during 8 hours is accompanied by the preservation of the bifidobacteria in the product. Additional introduction during the cultivation of whey hydrolyzate made it possible to significantly increase the amount of bifidobacteria in the product. The parameters of the introduction of whey hydrodisate into the biogel were studied. Samples of products were obtained and their organoleptic characteristics were determined.*

ПРОДУКТЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ АККУМУЛИРОВАННЫХ ОТХОДОВ ОТ РАЗДЕЛКИ РЫБ

¹Зарубин Никита Юрьевич, канд. тех. наук, ведущий научн. сотрудник

²Бредихина Ольга Валентиновна, д-р тех. наук, доцент, ведущий научн. сотрудник

³Лаврухина Елизавета Васильевна, ст. специалист

⁴Гриневиц Александра Ивановна, канд. тех. наук, специалист

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», отдел инновационных технологий, Департамент технического регулирования, Москва, Россия, e-mail: ¹zar.nickita@yandex.ru

Решаются вопросы рационального использования в пищевой промышленности отходов, полученных после разделки рыб, содержащих в своём составе высокую массовую долю коллагена. Предложена технология переработки данного вида сырья на белковый гидролизат как источника пептидов коллагенового волокна и незаменимых аминокислот. Процесс проходит за счёт биотрансформации отходов протеолитическим ферментным препаратом и последующим получением сухого продукта в виде порошка. Представлены результаты исследований по оценке уровня качества белкового гидролизата из отходов от разделки рыб семейства тресковых (минтай, треска).

Введение

В настоящее время, отходы от разделки рыб в основном (до 90 %) являются сырьем для производства кормовой муки, а также рыбного жира и технической продукции. При глубокой разделке рыбного сырья превалирует выход отходов (головы, кожа, чешуя, кости, плавники), варьирующийся от 38,0 до 58,0 % в зависимости от видового состава сырья. Процентное содержание выглядит следующим образом: головы – 9,2-33,2 %; кожа – 2,0-12,6 %; плавники с хвостами – 0,8-8,0 %, плавательные пузыри – 0,4-11,4 %, чешуя – 0,8-6,0 %, кости – 9,0-19 % [1, 2].

Однако известно, что отходы от разделки рыб – высокоценное технологическое сырье для получения биологически активных веществ (БАВ), в частности коллагена и продуктов на его основе. Для выделения БАВ целесообразно использовать биотехнологические способы биотрансформации [3, 4] сырья, в частности ферментативную обработку с применением ферментных препаратов класса протеаз, позволяющие разрушить связи между белками и углеводами, и при этом сохранить нативную структуру и свойства компонентов [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11].

В связи с этим, разработка и совершенствование биотехнологических способов биотрансформации отходов от разделки рыб с целью получения белковых гидролизатов в биокомплексе с сопутствующими природными компонентами является актуальной. Данный вид продукта может быть использован при моделировании рецептур и композиционных составов инновационных продуктов пищевого и профилактического назначения.

Объекты и методы исследования

Для получения гидролизата использовали аккумулярованную коллагенсодержащую массу (АКМ), полученную после разделки промысловых рыб семейства тресковых, таких как минтай Охотоморский (*Gadus chalcogrammus*) и трески Тихоокеанская (*Gadus macrocephalus*) и состоящая из голов, кожи, плавников с хвостами, костей и хрящей, а также внутренности в т.ч. плавательные пузыри. Данные виды рыб имеют высокие показатели вылова (объем добычи минтая и трески в России в промысловом сезоне 2020 года - 993,8 тыс. т и 156,16 тыс. т соответственно [12, 13], а также наиболее часто подвергаются глубокой разделке и переработке в прибрежной зоне при производстве рыбных продуктов, что обуславливает образование значительного количества отходов на предприятиях РФ, которые используются в производстве кормовой и технической продукции или подвергаются утилизации.

Для составления АКМ отходы от разделки рыб смешивали в равных частях: на 1 кг АКМ использовали 0,5 кг отходов от разделки минтая и 0,5 кг отходов от разделки трески, в которых было 0,1 кг голов с плечевыми костями и прирезью брюшка, 0,1 кг кожи рыб, 0,1 кг плавников с хвостами, 0,1 кг позвоночных костей, и 0,1 кг внутренностей в т.ч. плавательных пузырей (без печени) каждого вида рыбы.

Для ферментативного гидролиза белков рыбного коллагенсодержащего сырья был выбран ферментный препарат Протозим. Сухой ферментный препарат бактериальной протеазы, полученный путем направленной ферментации селекционного штамма *Bacillus licheniformis*. Ферментный препарат катализирует гидролиз высокомолекулярных белков с образованием низкомолекулярных пептидов, способен воздействовать на белки соединительной ткани. Протеолитическая активность – 50 000 ед/г, рабочий диапазон температур – 25-70 °С, рабочий диапазон рН – 5,5-11,0 [14].

При этом, выбирая способ гидролиза АКМ, руководствовались тем, что ферментный гидролиз менее трудоемок. Кроме этого, данный способ более безопасный с экологической точки зрения, не требует нейтрализации химическими реагентами, больших потерь времени, а также затрат на очистку сточных вод, по сравнению со щелочной и кислотной обработкой.

Способ получения белкового гидролизата из АКМ

С целью получения белкового гидролизата, АКМ предварительно промывали проточной водой температурой 8-12°С в течение 15-20 мин. После промывания АКМ подмораживали при температуре минус 25 °С в течение 2 ч и измельчали на волчке с диаметром прорезной решётки 2-3 мм и проводили гидролиз с использованием ферментного препарата Протозим. Для этого соответствующее количество ферментных препаратов растворяли в 100 мл воды и заливали в реакционную смесь. Концентрация ферментного препарата – 0,05-0,2 % к массе отходов; продолжительность гидролиза – 4,0-8,0 ч при температуре 30±5 °С, гидромодуль 1:1. После процесса гидролиза проводили инактивацию ферментных препаратов, для этого реакционную смесь доводили до температуры 70 °С и выдерживали в течение 15 мин и отделяли водный раствор от массы фильтрованием.

Массу гидролизата подвергали вымачиванию в 4-10 %-ным водном растворе лимонной кислоты (гидромодуль 1:1) в течение 2-6 ч при постоянном перешивании.

После вымачивания раствор от массы белкового гидролизата отделяли на пилотной установке для микро- и ультрафильтрации УФ-401/402 при температуре 48-52 °С. Для ультрафильтрации использовали мембраны типа УПМ из ароматического полисульфонамида, задерживающая способность которой от 20000 до 100000 Да [7, 10, 11, 15].

В результате ультрафильтрации получали ультра концентрат, который затем отправляли на лиофильную сушку, измельчали и получали сухой коллагенсодержащий гидролизат. Выход сухого продукта составляет в среднем 10 %. Следует отметить, что применение лиофильной сушки обеспечивает высокую сохранность нативных свойств, быструю регидратацию и растворимость мелкодисперсного и порошкового гидролизата, а низкая конечная влажность в продукте по сравнению с другими видами сушки, позволяет хранить продукт более 1 года [16].

В работе применяли современные методы исследований:

Массовые доли сухих веществ, воды, липидов, общего азота (последующим пересчетом на белок с использованием коэффициента 6,25), золы определяли по ГОСТ 31339 -2006 и ГОСТ 7636-85 [17, 18].

Содержание коллагена определяли по оксипролину колориметрическим методом Ньюмана и Логана [19, 20].

Аминокислотный состав белков определяли методом хроматографического разделения аминокислот, модифицированных с помощью ортофталевого альдегида и b-меркаптоэтанола с использованием обращенно-фазной ВЭЖХ на хроматомасс-спектрометрической системе LCMS-QP8000 фирмы «Shimadzu» (Япония) [21, 22].

Молекулярную массу белков в гидролизате определяли вискозиметрическим методом с применением вискозиметра Оствальда [19, 11], а также с использованием метода эксклюзионной ВЭЖХ на жидкостном хроматографе LC-10Avp («Shimadzu», Япония).

Энзиматическую активности ферментного препарата определяли модифицированным методом Ансона с применением казеината натрия [19].

Показатель ионов водорода (рН) определяли потенциометрическим методом, основанном на приготвлении водной вытяжки и измерении рН универсальным иономером рН-340 [19, 17].

Растворимость гидролизата в воде определили визуально в проходящем свете [19].

Степень гидратации определяли путем добавления определенного количества воды к образцу (по 0,1 мл) до получения однородной, мягкой и мажущей консистенции без отделения жидкости при размещении его на решетке [11].

Степень сыпучести гидролизата определяли по ОФС.1.4.2.0016.15 [23].

Пористость пластин гидролизата определяли по ГОСТ 5669-96 [24].

Угол естественного откоса порошка гидролизата определяли по ГОСТ 28254-2014, ОФС.1.4.2.0016 [23, 25]

Органолептические показатели определяли визуальным, обонятельным и вкусовым методом с использованием словесной характеристики свойств и балльной шкалы [26].

Результаты и их обсуждение

Были проведены исследования по изучению химического состава отходов от разделки минтая и трески с целью обоснования использования в составе АКМ для получения белкового гидролизата. Данные исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Химический состав отходов от разделки рыб семейства тресковых

Вид отходов	Вода, %		Белок, %		Коллаген, %		Липиды, %		Минеральные вещества, %	
	мин-тай	треска	мин-тай	треска	мин-тай	треска	мин-тай	треска	мин-тай	треска
Головы с плечевыми костями и прирезью брюшка	78,55 ±1,44	78,21 ±1,43	16,41 ±0,40	15,71 ±0,39	11,37 ±0,28	10,02 ±0,24	1,34 ±0,03	0,77 ±0,01	3,70 ±0,09	5,37 ±0,14
Кожа	76,32 ±1,41	75,79 ±1,39	19,49 ±0,48	18,61 ±0,46	15,23 ±0,38	14,38 ±0,34	1,23 ±0,03	1,03 ±0,02	2,97 ±0,06	3,56 ±0,08
Плавники с хвостами	77,67 ±1,42	79,55 ±1,45	16,71 ±0,41	14,38 ±0,36	13,56 ±0,33	11,52 ±0,27	1,28 ±0,03	0,53 ±0,01	4,37 ±0,12	5,54 ±0,14
Позвоночная кость	79,34 ±1,46	74,32 ±1,36	15,68 ±0,38	18,25 ±0,45	11,21 ±0,28	13,51 ±0,32	0,88 ±0,01	0,75 ±0,01	4,10 ±0,12	6,68 ±0,15
Внутренности в т.ч. плавательные пузыри (без печени)	75,32 ±1,38	74,47 ±1,36	19,10 ±0,47	19,96 ±1,36	15,31 ±0,38	14,98 ±0,35	2,35 ±0,06	2,58 ±0,06	3,23 ±0,08	2,99 ±0,06
АКМ	74,41±1,36		21,23±0,52		17,07±0,42		1,31±0,03		3,05±0,06	

Согласно данным исследования таблицы 1 можно сделать вывод, что показатели химического состава не имеют сильных различий между собой. Во всех видах отходов высокое содержание белка (более 15 %) и коллагена (более 10 %) по сравнению с содержанием жира и минеральных веществ. В связи с этим, смешивание отходов не приведет к ухудшению химического состава, а именно содержанию белка и коллагена, что подтверждено исследованиями данных показателей в аккумулязированной коллагенсодержащей массе. Исследование химического состава приготовленной АКМ установило, что содержания белка в ней 21,32 %, в т.ч. коллагена 17,07 %, что составляет более 80 % от общего белка и является положительным фактором для получения белковых гидролизатов с содержанием пептидов коллагенового волокна. Массовая доля липидов изучаемых отходов от разделки рыб находилась в пределах значений от 1,0 до 2,6 %, а минеральных веществ от 2,97 до 6,68 %, в частности в АКМ – 1,31 (липидов) и 3,05 (минеральных веществ) % соответственно. Низкое содержание липидов является положительным фактором для лиофильной сушки, так как жирное сырье не рекомендуется подвергать лиофилизации в связи с низким качеством и сроком годности [16, 27].

Ввиду этого, в работе использовали смесь отходов (АКМ) от разделки минтая и трески в равных долях, что является рациональным, так как данный вид рыб относится к одному семейству и имеет схожий химический состав [19, 7, 8].

Проведены исследования по изучению показателей качества (таблица 2) лиофилизированного белкового гидролизата, полученного путем биотрансформации АКМ из отходов от разделки рыб семейства тресковых (минтай, треска) [10, 11].

Таблица 2

Показатели качества лиофилизированного белкового гидролизата, полученного из кожи рыб семейства тресковых (минтай, треска)

Растворимость в воде		Частичная
Внешний вид раствора		незначительная замутненность
Запах и вкус		нейтральный
Цвет порошка		светло-серый
Сыпучесть, г/с		0,83-0,91
Пористость, %		73,5-81,2
Угол естественного откоса, °		42-45
Энзиматическая активность порошка		отсутствует
рН 10 %-ного водного раствора, ед		4,5-4,9
Степень гидратации, г гидролизата / г воды		1:4
Массовая доля, %	воды	4,2-6,5
	белка	90,7-93,5
	коллагена*	84,3-86,1
	липидов	0,6-0,8
	минеральных веществ	1,7-2,0

* - % от общего белка

Леофилизированный гидролизат из АКМ в виде пластин толщиной 3–6 мм имел светло-серый свет, нейтральный запах и вкус и ломкую структуру, при этом он обладал пористостью (73,5–81,2 % – поры были распределены равномерно по всему его объёму). Порошок, полученный последующим измельчением пластин гидролизата, характеризовался «удовлетворительной» сыпучестью (0,83-0,91 %), что подтверждается значением угла естественного откоса (от 42° до 45°). Растворимость в воде частичная, с образованием незначительного замутнения. Энзиматическая активность порошка отсутствовала, показатель рН был на уровне 4,5-4,9 ед. Проведёнными исследованиями подтверждается высокая технологичность полученного гидролизата из АКМ.

Наряду с этим, сухой гидролизат содержал значительное количество белка – до 93,5 %, в том числе коллагена 86,1 % от общего белка, в связи, с чем его можно рекомендовать к использованию как самостоятельную белковую добавку, а также в качестве структурообразователя за счет фрагментов коллагенового волокна. Аминокислотный состав гидролизата характеризовался присутствием пролина и гидроксипролина (9,76 и 8,51 %). При этом в гидролизате высокая доля глицина – 33,2 %. Глицин, пролин и гидроксипролин являются наиболее важными аминокислотами в коллагене, которые составляют 50 % от общего содержания аминокислот в белке. Содержания пролина и гидроксипролина особенно важно для желирующего эффекта и стабилизации тройной спирали коллагена из-за его способности связывать водород через –ОН - группу, что также влияет на технологические свойства [28, 29]. В гидролизате из АКМ присутствует незначительное количество липидов, массовая доля которых составляет менее 1 %, что говорит о возможности использования в составе низкокалорийных пищевых продуктов. Массовая доля минеральных веществ находилась в интервале значений от 1,7 до 2,0 %.

Молекулярная масса белкового гидролизата варьировалась в пределах 10,59 – 110,81 кДа, что позволяет сделать вывод, что гидролизат содержит фрагменты коллагеновых волокон (коллагена более 80 %), представленных ди-, три- и других низкомолекулярными, а также среднемолекулярными пептидами. Исследования по определению молекулярной массы свидетельствуют о структурных изменениях, которые произошли в полипептидных цепочках коллагена под действием ферментативного гидролиза, и указывают на присутствие в матрице комплексов из пептидных цепей белка, которые способствуют формированию гелей и студней, способных в дальнейшем повышать стабильность пищевых систем и готовых продуктов на их основе.

Таким образом, биотрансформация отходов от разделки рыб семейства тресковых способствовала деструкции их морфологической структуры, которая выражалась в виде набухания и разрыхления пучков коллагеновых волокон, что связано, в первую очередь, с разрушением белковых комплексов.

Выводы

В результате проведенных исследований обоснована возможность решения проблем переработки отходов от разделки рыб с применением биотехнологических способов, что позволяет получить биологически активный продукт – белковый гидролизат, характеризующийся высоким содержанием белка (свыше 80,0 %) с присутствием фрагментов коллагенового волокна, который возможно применять в технологиях поликомпонентных пищевых продуктов, в том числе функциональных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Цибизова М. Е. Практические аспекты получения структурообразователей из коллагенсодержащего рыбного сырья / М. Е. Цибизова, Р. Г. Разумовская, Као Тхи Хуе, Г. А. Павлова // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2011. – № 1. – С. 145-151.
2. Единые нормы отходов, потерь, выхода готовой продукции и расхода сырья при производстве пищевой продукции из морских гидробионтов
3. ГОСТ Р 57095-2016 Биотехнологии. Термины и определения. – Введ. 01.05.2017. – М.: Стандартинформ, 2018. – 20 с.
4. ГОСТ Р 57079-2016 Биотехнологии. Классификация биотехнологической продукции. – Введ. 01.05.2017. – М.: Стандартинформ, 2020. – 24 с.
5. Антипова, Л. В. Коллагены: источники, свойства, применение / Л. В. Антипова, С. А. Сторублевцев. – Воронеж: Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2014. – 522 с.
6. Бредихина, О. В. Научные основы производства рыбопродуктов: учебное пособие / О. В. Бредихина, С. А. Бредихин, М. В. Новикова. – Санкт-Петербург: Лань, 2016. – 232 с.
7. Као Т. Х. Некоторые аспекты технологии получения желатина из коллагенсодержащих вторичных рыбных ресурсов: обзор / Т. Х. Као, Т. М. Х. Нгуен, В. Х. Нгуен [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2014. – Т. 9. – № 1. – С. 23-32.
8. Кильмаев, А. А. Исследование ферментативного гидролиза малоценного рыбного сырья в технологии получения белковых продуктов / А. А. Кильмаев, Р. Г. Разумовская // Вестник Астраханского государственного технического университета. – 2007. – № 3(38). – С. 120-124.
9. Лагуткина, Л. Ю. Аквакультура: приоритеты, ресурсы, технологии / Л. Ю. Лагуткина, О. Ю. Лагуткин // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2011. – № 3. – С. 49-56.
10. Zarubin N. PROTEIN HYDROLYSATE AS A PRODUCT OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESSING OF FISH FILLETING WASTE Zarubin N., Strokova N., Kharenko E., Bredikhina O. В сборнике: 20th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2020. Sofia, 2020. С. 295-302.
11. Zarubin N.Yu Application of the gadidae fish processing waste for food grade gelatin production Zarubin N.Yu., Kharenko E.N., Bredikhina O.V., Arkhipov L.O., Zolotarev K.V., Mikhailov A.N., Nakhod V.I., Mikhailova M.V. Marine Drugs. 2021. Т. 19. № 8.
12. Добыча (вылов) водных биологических ресурсов российскими пользователями в отчетном году в сравнении с предыдущим годом [Электронный ресурс]. URL: http://fish.gov.ru/files/documents/otraslevaya_deyatelnost/organizaciya_rybolovstva/osvoenie_ODU/2020/diagrammy_osvoenie_kvot_16_11_2020.pdf (дата обращения: 07.08.2022).
13. Объем добычи минтая в 2020 году вырос на 5,2% [Электронный ресурс]. URL: <https://fishretail.ru/news/obem-dobichi-mintaya-v-2020-godu-viros-na-52-407221> (дата обращения: 07.04.2021).
14. Протозим (протеаза бактериальная щелочная) [Электронный ресурс]. <https://tdbiopreparat.ru/docs/protozim-pib.pdf> (дата обращения: 07.08.2022).
15. Патент № 2025476 Российская Федерация, МПК C09H1/00 C09H3/02, Способ получения фотографического желатина / Бобров В.Ф., Гуцалюк В.М., Игнатова Л.А., Каталевский Е.Е., Устинова Л.Н.,

Ушаков Н.В., Заявитель и патентообладатель: Казанское Арендное Предприятие, № 4935589/13, 1991-05-12, заявл. 06.12.91; опублик. 30.12.94.

16. Семенов Г.В. Сублимационная сушка / Г. В. Семенов И. С. Краснова. М.: ДеЛи, 2021. 326 с.

17. ГОСТ 31339-2006 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб. – М.: Изд-во Стандартиформ, 2010 – 15 с.

18. ГОСТ 7636-1985 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. – М.: Стандартиформ, 2010 – 86 с.

19. Антипова, Л.В. Современные методы исследования сырья и продуктов животного происхождения / Антипова Л. В. – Воронеж.: Воронежский ЦНТИ – филиал ФГБУ «РЭА» Минэнерго России, 2014. – 531 с.

20. Neuman R. E., Logan M. A. The determination of hydroxyproline. – «J. biol. Chem.», 1950, v. 184, p. 299–306.

21. Antoine F. R. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthalaldehyde precolumn derivatization / F. R. Antoine, C. I. Wei, R. C. Littell, M. R. Marshall // J. Agr. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, No. 12. – P. 5100-5107.

22. Zhou W. Liquid-chromatography quantitative analysis of 20 amino acids after derivatization with FMOC-Cl and its application to different origin Radix isatidis / Zhou W., Zhanga X.-Y., Duana G.-L. // J. Chin. Chem. Soc. – 2011. – Vol. 58, No. 4. – P. 509-515.

23. ОФС.1.4.2.0016.15 Степень сыпучести порошков. URL: <https://nevacert.ru/reestry/pharmacoroeia/ofs.1.4.2.0016.15> (дата обращения: 28.08.2022).

24. ГОСТ 5669-96 Хлебобулочные изделия. Метод определения пористости. – Введ. 01.08.1997. – М.: Стандартиформ, 2006. – 5 с.

25. ГОСТ 28254-2014 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения объемной массы и угла естественного откос. – Введ. 01.01.2016. – М.: Стандартиформ, 2020. – 13 с.

26. Ким Г. Н. Сенсорный анализ продуктов переработки рыбы и беспозвоночных: учебное пособие / Г. Н. Ким, И. Н. Ким, Т. М. Сафронова, Е. В. Мегеда. – Санкт-Петербург: Лань, 2014. – 512 с.

27. Горлатов А. С. Отбор и подготовка рыбного сырья для сублимационной сушки // Известия вузов. Пищевая технология. 2001. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otbor-i-podgotovka-rybnogo-syrya-dlya-sublimateionnoy-sushki-1> (дата обращения: 30.08.2022).

28. Северина, Е.С. Биохимия: Учеб. для вузов /Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2003. – 779 с.

29. Язенкова, Д. С. Ферментация рыбного сырья как один из этапов получения структурообразователя из костной ткани / М.Е. Цибизова, Д.С. Язенкова // Вестник АГТУ. – 2013 – № 1 – С 207–213.

BIOTRANSFORMATION PRODUCTS OF ACCUMULATED WASTE FROM CUTTING FISH

¹Zarubin Nikita Yuryevich, Candidate of Sciences in Technology, Leading Researcher of the Department of Innovative Technologies of the Department of Technical Regulation

²Bredikhina Olga Valentinovna, Doctor of Sciences in Technology, Leading Researcher of the Department of Innovative Technologies of the Department of Technical Regulation

³Lavrukhina Elizaveta Vasilyevna, Senior Specialist of the Department of Innovative Technologies of the Department of Technical Regulation

⁴Grinevich Alexandra Ivanovna, Candidate of Sciences in Technology, Specialist of the Department of Innovative Technologies of the Department of Technical Regulation

^{1,2,3,4}Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow, Russia, e-mail: ¹zar.nickita@yandex.ru

The paper addresses the issues of rational use in the food industry of waste obtained after cutting fish containing a high mass fraction of collagen. The technology of processing this type of raw material

into protein hydrolysate as a source of collagen fiber peptides and essential amino acids is proposed. The process takes place due to the biotransformation of waste by a proteolytic enzyme preparation and the subsequent production of a dry product in the form of a powder. The results of investigate on the assessment of the quality level of protein hydrolysate from waste from cutting fish of the cod family (pollock, cod) are presented.

УДК 663.8:577.15-047.84

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЗАТИРАНИИ ЗЕРНОПРОДУКТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ОСНОВ

¹Каменская Елена Петровна, канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры «Технология бродильных производств и виноделия»

²Колесниченко Марина Николаевна, канд. техн. наук, доцент кафедры «Технология бродильных производств и виноделия»

³Дикалова Елена Сергеевна, ст. преподаватель кафедры «Технология бродильных производств и виноделия»

^{1,2,3}Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия, email: ²mar.kolesnichenko2012@yandex.ru

В настоящем исследовании рассматривается влияние различных ферментных препаратов микробного происхождения на процесс затирания зернопродуктов и физико-химические показатели зернового суслу в технологии получения концентрированных основ. Установлено, что оптимальным при затирании зернопродуктов с использованием в качестве несоложенного сырья ржи и пшеницы является применение ферментного препарата – Амилосубтилин Г3х (0,1 % к массе сырья), а при использовании ржи и ячменя пивоваренного – Протосубтилин Г3х (0,4 % к массе зернопродуктов).

В современной России производство ферментированных напитков на зерновой основе, в том числе квасов брожения, относится к динамично развивающемуся сегменту рынка безалкогольных напитков. Напитки из зернового сырья обычно производят путем сбраживания суслу, полученного с помощью концентрированных основ, к которым относят концентрат квасного суслу (ККС), солодовые, ячменно-солодовые и зерновые концентраты, а также сброженные концентрированные основы. При этом, основным полуфабрикатом для производства квасов является концентрат квасного суслу, традиционно получаемый путем затирания с водой ферментированного ржаного солода, ржаной муки и других зернопродуктов, с последующим фильтрованием затора, упариванием квасного суслу и термообработкой ККС [1,2].

При производстве концентрированных основ широко используются зерновые культуры, содержащие в своем составе значительное количество углеводов, небольшое количество белка и обладающие значительным ферментативным потенциалом. К таким культурам, относят рожь, ячмень и пшеницу. В настоящее время широкое применение в индустрии напитков в качестве несоложенного зернового сырья находят кукуруза и рис, в меньшей степени овес и сорго. Кроме того, в последние годы активно осваиваются новые виды зерновых культур, такие как тритикале, амарант, полба, гречиха [3].

Известно, что качество концентрированных основ во многом зависит от вида перерабатываемого зернового сырья, способов и режимных параметров его переработки, в частности особенностей подготовки и затирания зернопродуктов, а также от особенностей протекания технологических процессов на стадиях производства. Поэтому подбор в рецептурах заторов различных комбинаций соложенных и несоложенных зерновых культур позволит не только повысить качество продукции,

но и снизить её себестоимость и расширить ассортимент. Поскольку несоложеное сырье практически не имеет ферментативной активности, то при увеличении доли несоложенных зернопродуктов более 20 % потенциала ферментов солода, как правило, недостаточно для их расщепления, поэтому возникает необходимость дополнительного внесения ферментных препаратов (ФП), иначе процессы расщепления затянутся или полностью прекратятся. Одним из эффективных путей решения вопроса улучшения технологических показателей и реологических свойств квасного суслу в технологии получения концентрированных основ с использованием в заторе несоложеного сырья является применение на стадии затирания комплексных ферментных препаратов.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния ферментных препаратов микробного происхождения на процесс затирания зернопродуктов и физико-химические показатели зернового суслу в технологии получения концентрированных основ.

Объектами данного исследования служили: 8 образцов суслу, приготовленные с использованием разных комбинаций несоложенных зерновых культур (ржи, пшеницы или ячменя), а также ферментных препаратов бактериального и грибного происхождения, либо без внесения ФП.

Для проведения ферментативного гидролиза несоложеного сырья использовали отечественные ферментные препараты производства ООО ПО «Сиббиофарм», г. Бердск в установленных экспериментальным путем дозах внесения: Амилаسوبтилин ГЗх – 1,0 г/кг, ЦеллоЛюкс-А – 0,5 г/кг, Протосубтилин ГЗх – 4,0 г/кг.

В ходе эксперимента в полученном сусле определяли концентрацию редуцирующих сахаров (РС) методом Бертрана; аминный азот – медным способом; содержание растворимых сухих веществ (РСВ) – рефрактометрически; активную кислотность рН – при помощи автоматического анализатора ST2100-F. Все результаты обработаны методом математической статистики и являются достоверными. В таблице 1 приведены сведения о ферментных препаратах, применяемых в настоящем исследовании.

Таблица 1

Основная характеристика ферментных препаратов

Наименование препаратов	Ферменты	Активность основного фермента	Продуцент	Параметры	Оптимальные условия действия
ЦеллоЛюкс-А	целлюлаза, ксиланаза, β-глюканаза, глюкоамилаза	Целлюлолитическая активность - 2000±200 ед/г	Trichoderma viride	Температура, °С	50-60
				рН, ед	4,0-6,0
Амилаسوبтилин ГЗх	α-амилаза, нейтральные и слабощелочные протеиназы, β-глюканаза, целлюлаза, ксиланаза	Амилолитическая активность - 1000±100 ед/г	Bacillus subtilis	Температура, °С	50-65
				рН, ед	5,5-7,0
Протосубтилин ГЗх	нейтральные и щелочные протеиназы, α-амилаза, β-глюканаза, ксиланаза, целлюлаза	Протеолитическая активность – 70±7 ед/г	Bacillus subtilis	Температура, °С	45-55
				рН, ед	6,0-7,0

Как видно из таблицы 1, ферментный препарат ЦеллоЛюкс-А, получаемый путем глубокого культивирования гриба-аскомицета *Trichoderma viride* обладает комплексным действием и служит для расщепления некрахмалистых полисахаридов, целлюлозы, ксиланов, β-глюканов растительной клетки до легко доступных низкомолекулярных углеводов, а также улучшает реологические свойства суслу. В природном сырье целлюлозе всегда сопутствует гемицеллюлоза, поэтому присутствие ксиланазы с высокой активностью (6000±600 ед/г) в препарате дает возможность эффективно воздействовать на структурные биополимеры сырья [4].

Основным ферментом комплексного ФП Амила субтилин ГЗх является α -амилаза, которая гидролизует внутренние α -1,4-гликозидные связи крахмала и продуктов его расщепления до декстринов различной молекулярной массы и олигосахаридов, тем самым повышая содержание сбраживаемых сахаров в сусле и снижая вязкость растворов [4].

Нейтральные и щелочные бактериальные протеиназы, входящие в ФП Протосубтилин ГЗх, с протеолитической активностью — 70 ± 7 ед/г катализируют гидролитическое расщепление белков до низкомолекулярных пептидов, воздействуя на глубинные пептидные связи, что улучшает технологические показатели сусла и способствует снижению его вязкости [4].

В ходе выполнения эксперимента для осуществления ферментативного гидролиза компонентов сырья настольным способом проводился процесс затирания, состоящий из смешивания дробленых сухих зернопродуктов с водой и последующей выдержки температурных пауз. План эксперимента по изучению ФП на состав зернового сусла приведен в таблице 2.

Таблица 2

План эксперимента по изучению влияния ферментных препаратов на состав сусла

Состав затора, % к массе сырья	Варианты опытов							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Солод ржаной сухой ферментированный	22	22	22	22	22	22	22	22
Солод ржаной сухой неферментированный	27	27	27	27	27	27	27	27
Солод ячменный	11	11	11	11	11	11	11	11
Рожь	20	20	20	20	20	20	20	20
Ячмень пивоваренный	20	20	20	20	-	-	-	-
Пшеница	-	-	-	-	20	20	20	20
Амила субтилин ГЗх	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-
ЦеллоЛюкс-А	-	0,05	-	-	-	0,05	-	-
Протосубтилин ГЗх	-	-	0,4	-	-	-	0,4	-

В лабораторных условиях получали 8 опытных образцов заторов с различным составом зернопродуктов, изложенным в таблице 2 и добавками ФП. Дробленные зернопродукты смешивали с водой ($pH=5,9$ ед) при температуре $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и гидромодуле 1:10 при постоянном перемешивании для образования равномерной массы. В навесках зернопродуктов использовалось 40 % несоложенного сырья, а именно в равных количествах рожь и ячмень (варианты 1-4); рожь и пшеница (варианты 5-8) с применением различных ФП, либо без них (варианты 4 и 8). Далее в опытные заторы 1-3 и 5-7 тонкой струйкой вносили растворы ферментных препаратов смешанные с 10-кратным объемом воды, а затем выдерживали 30 минут. При получении сусла использовали режим затирания, представленный в таблице 3.

Таблица 3

Температурные паузы настольного режима затирания

Операции	Температура, $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$	Продолжительность, мин
Выдержка	при 45	30
Подогрев	до 52	7
Выдержка	при 52	20
Подогрев	до 63	11
Выдержка	при 63	30
Подогрев	до 70	7
Выдержка	при 70	60
Подогрев	до 75	5
Выдержка	при 75	До осахаривания

После окончания нагрева затора до температуры $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ проверяли полноту осахаривания по йодной пробе, затем осахаренный затор фильтровали и определяли в сусле следующие показатели: содержание РСВ, pH , содержание РС и аминного азота (таблица 4).

Физико-химические показатели образцов зернового сусла

Варианты опытов	Растворимые СВ, %	pH, ед	Аминный азот, мг/100 мл	Содержание редуцирующих сахаров, г/дм ³
1	7,68 ± 0,11	5,47 ± 0,06	24,15 ± 0,35	28,26 ± 5,9
2	7,52 ± 0,03	5,43 ± 0,06	24,51 ± 2,10	28,52 ± 4,77
3	7,74 ± 0,06	5,43 ± 0,06	30,10 ± 0,70	31,52 ± 1,02
4 (без ФП)	7,20 ± 0,05	5,47 ± 0,06	24,50 ± 2,10	28,13 ± 3,13
5	6,57 ± 0,11	5,53 ± 0,06	23,70 ± 0,70	64,39 ± 2,57
6	6,47 ± 0,06	5,67 ± 0,06	17,50 ± 0,70	43,85 ± 2,69
7	6,77 ± 0,11	5,62 ± 0,03	25,80 ± 1,90	45,85 ± 1,80
8 (без ФП)	6,31 ± 0,06	5,63 ± 0,06	15,75 ± 0,35	42,55 ± 0,51

Согласно результатам, представленным в таблице 4, содержание РСВ в заторах, полученных с использованием в качестве несоложенного сырья ржи и ячменя незначительно превышало показатели РСВ в заторах с рожью и пшеницей в среднем на 1,0 %. Следует отметить, что максимальное содержание РСВ – 7,74 % наблюдалось в опыте 3 при использовании ржи и ячменя совместно с ФП Протосубтилин ГЗх. Во всех образцах сусла значения pH находились в диапазоне от 5,43 до 5,67 ед., что является благоприятным для дальнейшего совместного брожения дрожжей и молочнокислых бактерий. При анализе содержания редуцирующих сахаров установлено их максимальное содержание – 64,39 г/дм³ в опыте 5 с применением амилолитического ФП Амилосубтилин ГЗх и несоложенного сырья ржи и пшеницы, что превышает концентрацию РС контроля (без ФП) в 1,5 раза, а в опыте 1 с данным ФП, но с применением в заторе ржи и ячменя в 2,3 раза.

Известно, что отсутствие дефицита азотистых веществ в сусле – необходимое условие для питания дрожжей и их биосинтетической активности. Снижение α-аминного азота менее 20 мг/100 мл сусла приводит к уменьшению физиологической активности дрожжей, интенсивности их размножения, а также к торможению процессов брожения. Поэтому важно было проанализировать изменения содержания аминного азота, включающего в себя азот аминокислот и пептидов, в сусле под влиянием ФП. Так, выявлено закономерное максимальное содержание аминного азота в опытных образцах 3 (30,1 мг/100 мл) и 7 (25,8 мг/100 мл) с применением ФП Протосубтилин ГЗх, обладающего наибольшей протеолитической активностью – 70±7 ед/г. Между тем, наименьшее количество аминного азота – 15,75 мг/100 мл отмечалось в контрольном образце (8 вариант) без внесения ФП при использовании ржи и пшеницы.

Таким образом, для дальнейшего получения концентрированных основ, необходимых в производстве ферментированных напитков на зерновой основе, были отобраны два наиболее оптимальных варианта: 5-й опыт затирания зернопродуктов, в котором используются ФП Амилосубтилин ГЗх в количестве 0,1 % к массе сырья и в качестве несоложенного сырья – рожь и пшеница, а также 3-й опыт с ФП Протосубтилин ГЗх в количестве 0,4 % к массе зернопродуктов при стандартной активности препарата – 70±7 ед/г и в качестве несоложенного сырья используется рожь и ячмень пивоваренный.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исаева В.С. Современные аспекты производства кваса (теория, исследование, практика / В.С. Исаева. – М.: МИЦ «Пиво и напитки 21 век», 2009. 304 с.
2. Каменская Е.П. Перспективы использования полисолодовых экстрактов в технологии производства квасов брожения / Е.П. Каменская, М.В. Обрезкова, В.А. Вагнер // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. 2019. № 3 (56). С. 19-25.
3. Кобелев К.В. Научное обоснование и разработка инновационных технологий напитков на зерновой основе и их идентификация: дисс. ... докт. техн. наук: 05.18.01 / К.В. Кобелев, Москва, 2018. 310 с.
4. Технологическая инструкция по использованию ферментативных препаратов ООО по «Сиббиофарм» при производстве спирта из зерна ТИ 10-00334587-2-2005. М., 2005. 17 с.

5. Федорович Н.К. Характеристика и определение оптимальных условий действия ферментного препарата ЦеллоЛюкс-А / Н.К. Федорович, Е.В. Алексеенко // Биотехнология и продукты биологического синтеза. Материалы национальной научно-практической конференции. Изд-во: ФГБОУ ВО «МГУПП», Москва, 2018. С. 100-102.

USE OF ENZYME PREPARATIONS IN MASHING GRAIN PRODUCTS IN THE TECHNOLOGY OF OBTAINING CONCENTRATED BASES

¹Kamenskaya Elena Petrovna, candidate of biological sciences, associate professor, docent of the department of "Technology of fermentation and winemaking"

²Kolesnichenko Marina Nikolaevna, candidate of technical sciences, docent of the department of "Technology of fermentation and winemaking"

³Dikalova Elena Sergeevna, senior lecturer of the department of "Technology of fermentation and winemaking"

^{1,2,3}Altai State Technical University named after I.I. Polzunov, Barnaul, Russia, e-mail: ²mar.kolesnichenko2012@yandex.ru

This study examines the effect of various enzyme preparations of microbial origin on the process of mashing grain products and the physicochemical parameters of grain must in the technology for obtaining concentrated bases. It has been established that the optimal when mashing grain products using rye and wheat as unmalted raw materials is the use of an enzyme preparation - Amylosubtilin G3x (0.1% by weight of raw materials), and when using rye and malting barley - Protosubtilin G3x (0.4% by weight of grain products).

УДК 664.681.9

ТЕХНОЛОГИЯ МУЧНЫХ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ ПОВЫШЕННОЙ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ

¹Киселёва Екатерина Эдуардовна, студентка кафедры пищевой биотехнологии

²Землякова Евгения Сергеевна, канд. техн. наук, доцент кафедры пищевой биотехнологии

^{1,2}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия, e-mail: ¹ms.pepper2000@mail.ru; ²evgeniya.zemljakova@klgtu.ru

Мучные кондитерские изделия – пищевые продукты с высоким содержанием сахара и повышенной энергетической ценностью. Теория общегосударственной политической деятельности в сфере здорового питания учитывает расширение ассортимента пищевых продуктов функциональной направленности. В современных условиях перспективными улучшителями мучных кондитерских изделий могут быть продукты мукомольно-крупяного производства и овощепереработки, которые активно развиваются на территории Калининградской области. Представлены результаты исследований по разработке технологии по производству морковно-кунжутного печенья повышенной пищевой ценности.

ВВЕДЕНИЕ

Кондитерские изделия позиционируются производителями, как доступный продукт массового потребления привлекательного вида с выраженными вкусовыми и ароматическими свойствами, основным

компонентом, которого являются углеводы, их содержание варьируется от 35% до 70%.

По оценкам экспертов на сегодня этот рынок еще не исчерпал свой потенциал. Концепция государственной политики в области здорового питания предусматривает развитие и расширение ассортимента продуктов питания повышенной пищевой ценности. В настоящее время предприятия по производству кондитерской продукции вырабатывают изделия, представляющие собой группу пищевых продуктов, значительно различающихся по своему рецептурному составу, технологии приготовления и потребительским свойствам. Биотехнологическими улучшителями мучных кондитерских изделий могут быть продукты мукомольно-крупяного производства и овощепереработки. К ним относят рисовую, овсяную, кукурузную, пшеничную, гречневую муку, недоиспользуемое или вторичное овощное сырьё [1].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью настоящей работы являлось разработка технологии морковно-кунжутного печенья повышенной пищевой ценности. Были решены следующие задачи: обоснован выбор сырья, разработана и с использованием метода математического моделирования оптимизирована рецептура нового продукта, определены органолептические и физико-химические показатели качества морковно-кунжутного печенья.

МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

При разработке технологии обогащенного печенья, за основу была взята базовая технология производства овсяного печенья из сборника «Технология мучных кондитерских изделий» [2]. Технология морковно-кунжутного печенья предусматривает дополнение базовой технологии следующими операциями: подготовка и внесение пищевых компонентов моркови и кунжута, внесение рисовой муки и исключение жировых продуктов. В полученных образцах морковно-кунжутного печенья исследованы органолептические и физико-химические показатели качества.

В работе были использованы стандартные методы исследования, регламентируемые в соответствующих ГОСТах: методы определения органолептических показателей качества, размеров, массы нетто и составных частей, методы определения кислотности и щелочности, методы определения влаги и сухих веществ, метод определения массовой доли золы и металломагнитной примеси, метод определения намокаемости,

Органолептическую оценку нового продукта проводили с использованием разработанной 5-балльной шкалой органолептической оценки. Для оптимизации рецептуры морковно-кунжутного печенья использовали ортогональный центральный композиционный план (ОЦКП) второго порядка для 2-х факторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В технологии морковно-кунжутного печенья используется следующее сырьё: мука овсяная, мука рисовая, сахар-песок, разрыхлитель, соль, масло растительное, морковь, кунжут.

Мука овсяная – это диетический пищевой продукт, считается одним из самых полезных за счет высокого количества витаминов и минеральных веществ. Изделия из такой муки обладают легким овсяным ароматом. Овсяная мука в разы превосходит муку пшеничную по содержанию Na, K, Ca, Mg, P, Fe, витаминов группы B, уступая лишь в содержании витамина PP. Использование в рецептуре морковно-кунжутного печенья рисовой муки, богатой этим витамином, нивелирует его недостаток. Рисовая мука – это продукт, который получают из рисовых зерен. Основная её значимость, в сопоставлении с ежедневно используемой пшеничной мукой, складывается в том, что она не включает глютен, непереносимость которого фиксируется всё чаще [3].

Морковь идеально подходит для приготовления сладкой выпечки. Она придаёт сочность, цвет и сладость, улучшают текстуру и добавляет клетчатку и другие питательных веществ. Морковь в данной технологии используется в сыром натёртом виде, в технологии важна и влага, которая попадает в рецептурную смесь вместе с морковью.

Сырьё и пищевые добавки, применяемые для изготовления печенья, должны быть разрешены к применению в пищевой промышленности и по показателям безопасности соответствовать требованиям ТР ТС.

Планирование экспериментов при моделировании и оптимизации рецептуры нового продукта осуществляли с применением ортогонального центрального композиционного плана (ОЦКП) второго порядка для двух факторов.

В качестве факторов варьирования было выбрана масса муки и моркови, подлежащих регулированию и оптимизации. Значения изменяемых факторов, их интервалы и пределы варьирования представлены в таблице 1.

Таблица 1

Значение варьирования массы, кг/600 кг рецептурной смеси, интервалы и пределы

Факторы	Уровень (-1)	Уровень (0)	Уровень (+1)	Интервал варьирования
Масса муки	200	250	300	50
Масса моркови	230	250	270	20

План эксперимента в соответствии с матрицей ОЦКП второго порядка для двух факторов, а также данные для обработки полученных данных, приведены в таблице 2.

Таблица 2

Матрица и план эксперимента при моделировании рецептуры печенья

№ опыта	План эксперимента				Данные для математической обработки				
	Масса муки		Масса моркови		X ₀	X ₁ X ₂	X ₁ ² - 2/3	X ₂ ² - 2/3	Y
	в код. виде X ₁	в нат. виде т, кг	в код. виде X ₂	в нат. виде т, кг					
1	+1	300	+1	270	+1	+1	+1/3	+1/3	Y ₁
2	-1	200	-1	230	+1	+1	+1/3	+1/3	Y ₂
3	+1	300	-1	230	+1	-1	+1/3	+1/3	Y ₃
4	-1	200	+1	270	+1	-1	+1/3	+1/3	Y ₄
5	0	250	0	250	+1	0	-2/3	-2/3	Y ₅
6	-1	200	0	250	+1	0	+1/3	-2/3	Y ₆
7	+1	300	0	250	+1	0	+1/3	-2/3	Y ₇
8	0	250	+1	270	+1	0	-2/3	+1/3	Y ₈
9	0	250	-1	230	+1	0	-2/3	+1/3	Y ₉

Безразмерные параметры оптимизации y_i устанавливались с применением способа введения метрики, задающей близость к «идеалу», по формуле (1), представленной ниже.

$$y_i = \sum_{i=1}^n \left(\frac{y_{ui} - y_{u0}}{y_{u0}} \right)^2, \quad (1)$$

где y_{ui} – значение экспериментального частного отклика; y_{u0} – наивысшее значение i-го отклика («идеальное»); n – количество частных откликов.

Данная формула помогает учесть влияние на качественную характеристику y_i всех ее составляющих, независимо от их размерности и абсолютных значений. Чем ближе y_i к нулю, тем «идеальнее» условия эксперимента.

В качестве частных откликов были выбраны оценка в баллах: органолептические показатели – вкус и консистенция. Их «идеальные» значения, используемые в расчетах, приведены в таблице 3.

Частные отклики и их «идеальные» значения

Наименование частного отклика	Размерность измерения	«Идеальные» значения частного отклика
Вкус	Баллы	5,0
Консистенция	Баллы	5,0

Для объективной органолептической оценки морковно-кунжутного печенья была разработана 5-ти балльная шкала.

Спроектированная балльная шкала органолептической оценки готового продукта, приведена в таблице 4. Основной принцип оценки качества по предлагаемой шкале заключается в выделении признаков (цвет, вкус хрусткость), характеризующих данную продукцию.

Таблица 4

Описание уровней баллов при оценке качества готового продукта

Баллы	Описание баллов	
5	5,0 – 4,1 балла – отличное качество;	Соответствие нормативным показателям качества
4	4,0 – 3,1 балла – хорошая продукция;	Незначительные отклонения (признак выражен незначительно)
3	3,0 – 2,1 балла – удовлетворительное качество;	Заметные отклонения (признак выражен заметно)
2	2,0 – 1,1 балла – плохое качество (едва приемлемое) продукции;	Значительные отклонения (признак выражен значительно)
1	1,0 и менее баллов – очень плохое качество (неприемлемое) продукции	Чрезмерные отклонения (признак выражен сильно)

Реализация плана матрицы ОЦКП, а также обработка экспериментальных данных по заданным алгоритмам позволили получить полиномиальное уравнение второго порядка в натуральном виде, количественно связывающее процесс формирования качества готового морковно-кунжутного печенья с параметрами его проведения:

$$y = -92,965 + 0,36x_1 + 0,609x_2 - 0,005 x_1 x_2 - 0,00032x_1^2 - 0,00125 x_2^2 \quad (2)$$

Расчетные оптимальные значения, полученные методом дифференцирования уравнений в натуральном виде, оказались следующими:

- Масса муки в граммах = 249,21 г;
- Масса тертой моркови в граммах = 251,32 г.

Для расчёта рецептуры были приняты следующие значения: масса моркови 250 г, масса мука 250 г на загрузку.

На основании рассчитанных данных была построена геометрическая модель оптимизации рецептуры морковно-кунжутного печенья (рис. 1).

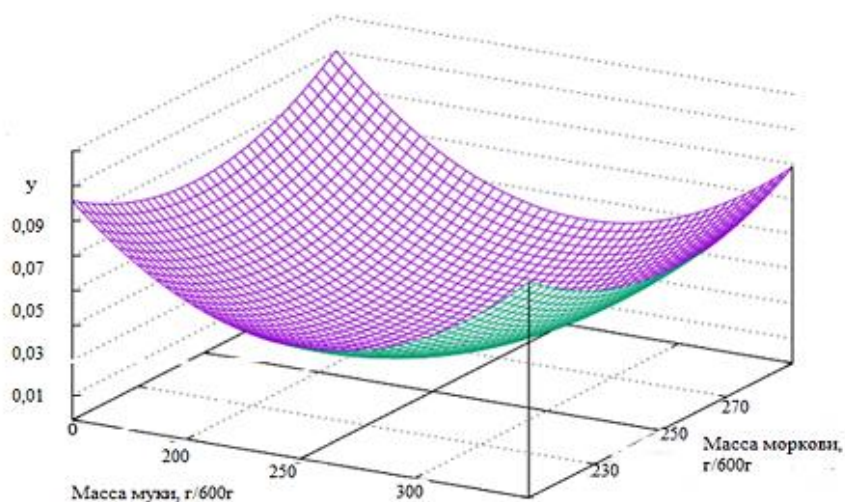


Рис.1. Геометрическая модель оптимизации рецептуры морковно-кунжутного печенья

Рецептура, с учётом полученных данных после оптимизации, морковно-кунжутного печенья представлена в таблице 5.

Таблица 5

Рецептура морковно- кунжутного печенья

Сырье	Расход сырья на загрузку (0,6 кг печенья), кг
Мука овсяная	0,150
Мука рисовая	0,100
Сахар-песок	0,050
Морковь тёртая	0,250
Разрыхлитель	0,005
Соль	0,0015
Растительное масло	0,05
Кунжут	0,030
Итого	0,630

Морковно-кунжутное печенье можно отнести к овсяному печенью, так как в состав входит не менее 14% овсяной муки в соответствии с разработанной рецептурой.

На основании комплекса проведенных исследований и анализа существующих технических решений была разработана технологическая схема производства морковно-кунжутного печенья, которая обеспечивает не только оптимальные физико-химические свойства готового продукта, но и высокие вкусовые показатели.

Основным достоинством разработанной технологии является то, что для производства печенья не требуется наличие жировых продуктов, которые подвержены порчи.

Технологическая схема разработанного морковно-кунжутного печенья приведена на рисунке 2.

Данные по содержания основных макроэлементов в новом печенье представлены в таблице 6.

Таблица 6

Химический состав морковно-кунжутного печенья на 100 г

Наименование	Белки	Жиры	Углеводы	Влага
Морковно-кунжутное печенье	8,75	26,53	51,88	9,6

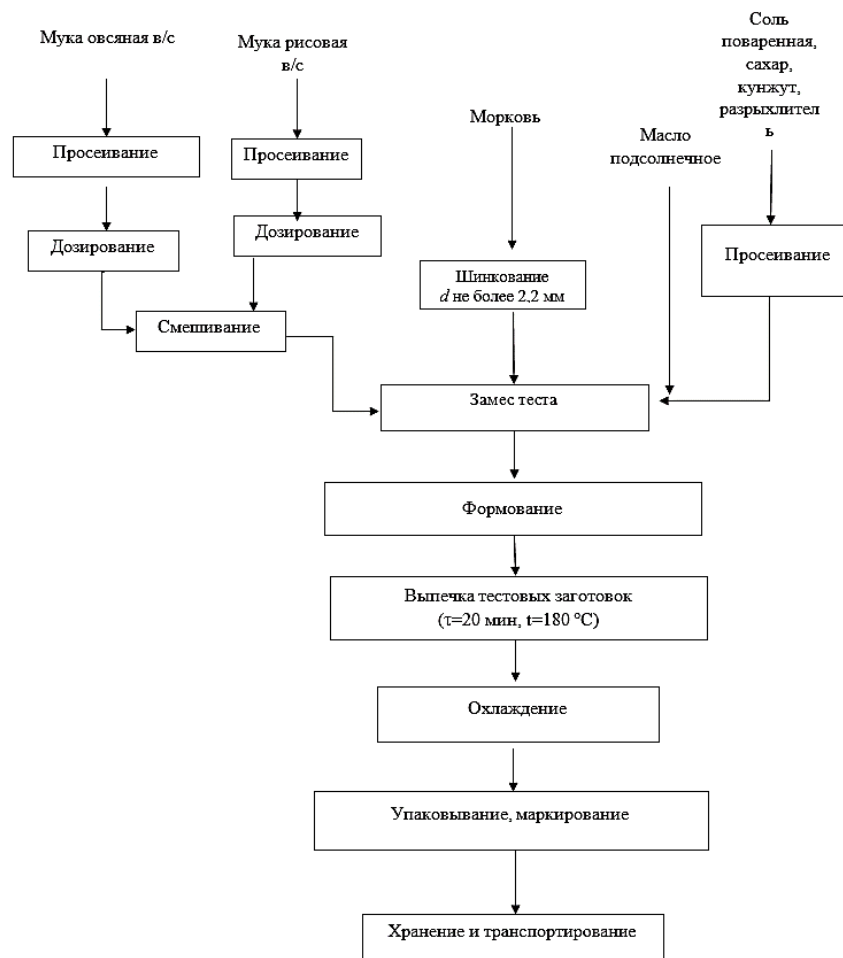


Рис. 2. Технологическая схема производства морковно-кунжутного печенья

В таблице 7 приведены физико-химические показатели качества нового печенья, которые будут регламентироваться проектом ТУ.

Таблица 7

Физико-химические показатели печенья

Наименование показателя	Значение показателя для печенья
Массовая доля влаги, %, не более	10,5
Массовая доля общего сахара (по сахарозе), % не более	6,0
Щелочность, град., не более	2,0
Намокаемость, %, не менее	150
Массовая доля золы, не растворимой в растворе соляной кислоты массовой долей 10%, %, не более	0,1
Массовая доля бета-каротиноидов, мг% не менее	0,36

Исходя из установленных экспериментальным путем уровней содержания ингредиентов, а также из литературных данных [10] по содержанию минеральных веществ в муке, моркови и кунжуте, был произведен расчет содержания макро- и микроэлементов, а также витаминный состав морковно-кунжутного печенья (таблица 8).

Витаминно-минеральный состав морковно-кунжутного печенья на 100 г

Наименование	Na, мг%	K, мг%	Ca, мг%	Mg, мг%	P, мг%	Fe, мг%	Кар, мкг%	В1, мг%	В2, мг%	РР, мг%
Морковно-кунжутное печенье	23,9	203	151,4	93,3	380,5	5,5	30000	0,23	0,133	1,23

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и оптимизирована рецептура, а также технология получения нового печенья повышенной пищевой ценности. Морковно-кунжутное печенье обладает высокими органолептическими характеристиками, пониженным содержанием жира, является источником макро- и микроэлементов (калия, кальция, фосфора, железа), каротиноидов и пищевых волокон. Внедрение технология позволит расширить использование овощей, в данном случае моркови, в кондитерской промышленности, что в свою очередь благотворно отразится на развитии аграрного сектора Калининградской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карташева, Л.В. Товароведение продовольственных товаров растительного происхождения / Л.В. Карташева, М.А. Николаева, Е.Н. Печникова. - М.: Деловая литература, 2004. – 213 с.
2. Корячкина, С.Я. Технология мучных кондитерских изделий: учебник / С.Я. Корячкина, Т.В. Матвеева. – СПб.: Троицкий мост, 2011. – 408 с.
3. Федорченко, А. Рисовая мука: как сделать и что приготовить [Электронный ресурс] // TutKnow.ru: [сайт]. URL: <https://tutknow.ru/meal/14656-risovaya-muka-kak-sdelat-i-cto-prigotovit.html>
4. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник / Под. ред. член-корр. МАИ, проф. И.М. Скурихина и академика РАМН, проф. В.А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 236 с.

TECHNOLOGY OF FLOUR CONFECTIONERY PRODUCTS OF INCREASED NUTRITIONAL VALUE

¹Kiseleva Ekaterina Eduardovna, student of the Department of Food Biotechnology

²Zemlyakova Evgeniya Sergeevna, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Department of Food Biotechnology

^{1,2}Kaliningrad State Technical University,

Kaliningrad, Russia, e-mail: ¹ms.pepper2000@mail.ru; ²evgeniya.zemljakova@klgtu.ru

Flour confectionery products are food products with a high sugar content and high energy value. The concept of state policy in the field of healthy nutrition provides for the expansion of the range of functional food products. In modern conditions, flour confectionery products can be promising improvers of flour and cereal production and vegetable processing, which are actively developing in the Kaliningrad region. The article presents the results of research on the development of technology for the production of carrot-sesame cookies with increased nutritional value.

ВЛИЯНИЕ ПЕРВИЧНОЙ ОБРАБОТКИ КОЖИ МИНТАЯ НА СОДЕРЖАНИЕ КОЛЛАГЕНА

¹Клипак Марина Борисовна, аспирант

²Слуцкая Татьяна Ноевна, д-р техн. наук, профессор

^{1,2}ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет», Владивосток, Россия, e-mail: ¹marina.81928@gmail.com

Представлены результаты исследования влияния способов первичной обработки кожи минтая на содержание соединительной ткани (коллагена). Рассчитан выход чистой кожи в зависимости от способа первичной обработки, влияние сублимационной сушки на её текстуру. Установлено, что содержание коллагена в коже незначительно меняется в зависимости от способа обработки, что характеризует кожу минтая как потенциальный источник для получения коллагена и(или) коллагеновых гидролизатов. Подобраны рациональные параметры ферментативного гидролиза кожи минтая.

Введение

Вопрос о рациональном использовании ресурсов Дальневосточного рыбохозяйственного бассейна является актуальным уже многие десятилетия. В современных реалиях также добавляются аспекты как экологической направленности (организация циклических и безотходных производств), так и импортозамещения.

Минтай является одним из основных промысловых видов рыб Дальнего Востока. В 2022 году объемы его вылова идут с опережением и к 30-му июня составляют 1,18 млн тонн, что на 8,3% выше показателей 2021 года [1]. Помимо этого, высоким остается спрос на производство продукции с высокой добавочной стоимостью, таких как филе, фарш и сурими, технология которых включает этап разделки тушки, в процессе которого образуется большое количество отходов (голова, кожа, плавники и внутренние органы). Особый интерес представляет кожа минтая, которая характеризуется высоким показателем белка (24,6-29,1%) в сравнении с другими отходами [2], а следовательно, является потенциальным источником коллагена, технологический и биотехнологический потенциал которого значительно возрос в последние годы.

Так, ферментный гидролизат из кожи минтая при содержании сухих веществ в количестве 25-30% способен образовывать стабильную эмульсию, что использовано при производстве соуса [3]. Другим вариантом использования гидролизата из кожи минтая является разработка основы для биологически активной добавки – тернарной полифункциональной пищевой композиции для различных продуктов питания. Способ включает промывку, зачистку, дезодорирование, обезжиривание, ферментализацию и сублимационную сушку. В смеси с растительными компонентами (кунжутная и черемуховая мука) предложенная композиция обладает высокой биологической ценностью, антиоксидантными и структурообразующими свойствами [4].

В целом анализ работ показал, что кожа в совокупности с остальными отходами (голова, плавники) используется для приготовления бульонов, которые характеризуется повышенной эмульгирующей и структурообразующей способностью, что используется при производстве полуфабрикатов на основе фарша и(или) соусов [5, 6], а также для производства кормовой муки. Разработка идей и способов получения и применения коллагенового гидролизата из кожи минтая является актуальной задачей, способствующей не только снижению количества образующихся отходов в процессе производства, но и увеличению ассортимента выпускаемой продукции в различных отраслях пищевой промышленности.

Целью данной работы являлось обоснование способов предварительной обработки кожи минтая, исследование её влияния на содержание соединительной ткани, а также подбор параметров ферментативного гидролиза.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась кожа минтая, полученная при производстве обесшкуреного филе на базе рыбоперерабатывающего завода ООО «Русский минтай».

Определение содержания белка, общего азота и массовой доли воды проводилось в соответствии с методиками по ГОСТ 7636-85 [7].

Сублимационная сушка исследуемых образцов проводилась при полном вакууме до содержания воды 5-9%.

Определение содержания оксипролина и соединительной ткани проводилось в соответствии с рекомендуемой методикой [8].

Степень гидролиза оценивали по накоплению сухих веществ в водорастворимой фракции.

В качестве вспомогательных материалов использовалась соль поваренная пищевая (ГОСТ Р 51574-2018 «Соль пищевая. Общие технические условия») и ферментный препарат «Протамекс» с протеолитической активностью 330 МЕ/г.

Результаты и их обсуждение

Первым этапом работы была очистка кожи минтая от грязи, слизи, остатков мышечной и хрящевой ткани посредством промывки, которая осуществлялась двумя способами.

В первом случае, кожа минтая заливалась холодным 1% солевым раствором при гидромодуле 1:10. Продолжительность выдержки при периодическом перемешивании составляла 6 ± 1 ч. Далее кожу промывали несколько раз проточной водой и один раз дистиллированной для полного удаления соли и примесей, затем отжимали и отправляли на обработку ферментом для удаления мышечной ткани и остатка иных отходов. В качестве ферментного препарата использовался «Протамекс» с протеолитической активностью 330 МЕ/г, в количестве 1% от массы сырья при гидромодуле 1:5. Продолжительность ферментной обработки составляла 4 ± 1 ч при комнатной температуре и периодическом перемешивании. По окончании процесса кожа промывалась проточной и дистиллированной водой, отжималась, после чего подвергалась незначительной зачистке: механически удалялись остатки мышечной ткани и хрящей с плавниками, не отделившихся на предыдущих этапах. Готовые пластины кожи подсушивали при комнатной температуре, затем измельчали до пластинок размером 15-20 мм для дальнейшего исследования.

Во втором случае, кожа аналогичным образом предварительно промывалась в холодном (температура 2-4°C) солевом растворе, с последующей промывкой проточной и дистиллированной водой, и отжиманием. После кожу зачищали вручную путем соскабливания тупой частью ножа остатков мяса, костей и плавников. Затем подвергали ферментной обработке, подсушиванию и измельчению аналогичным с первым вариантом способом, с разницей, что после ферментной обработки очистка не производилась, т.к. этот процесс был проведен этапом ранее.

В результате проведенных операций, было установлено, что выход очищенной и подсушенной кожи составил 36,2% для первого случая и 35,4% - для второго.

Подводя итог можно сказать, что зачистка кожи от мышечной ткани и её прирезей, хрящей, плавников и костей перед ферментной обработкой не является необходимой, т.к. большая их часть самостоятельно отделяется как при промывке в солевом растворе, так и при ферментной обработке. К тому же данный процесс является достаточно длительным и трудоёмким.

Далее, измельченная кожа подвергалась сублимационной сушке для придания хрупкой структуры (с целью дальнейшего измельчения до порошкообразного состояния).

Начальная влажность сырой кожи составляла в первом варианте (промывка осуществлялась без предварительной зачистки) – 59%, во втором варианте (промывка осуществлялась с зачисткой перед этапом ферментной обработки) – 34,5%. После сублимационной сушки влажность соответственно составила в 1-ом варианте – 5,9%, во 2-ом - 9,03%. Оба варианта выглядели идентично: кожа сухая, но не ломкая, напоминает по структуре сухую шелуху от семечек, легко режется ножницами на более мелкие пластики, но вручную не измельчается.

Для более тонкого измельчения было решено использовать мельницу (кофемолку). В результате, было выявлено что кожа не измельчается в «порошок», как ожидалось, а больше «разрыва-

ется», образуя при этом текстуру сухой ваты (пластины разрывались, образуя «нити»). Также отмечалось большое количество потерь: за счет образования легко летучей фракции. Подсушка в сушильном шкафу при температуре 40 °С в течение 5 ч также не дала положительного результата: ожидалось, что образцы (как целые, так и уже измельчённые) станут суше, и в процессе измельчения будет получена желаемая структура, однако результат был отрицательным.

Предположительно, для получения порошка из промытой кожи её предварительно можно обработать жидким азотом для создания более хрупкой текстуры, либо повторным высушиванием сублимационной сушкой или предварительной подсушкой в сушильном шкафу перед сублимационной сушкой.

Для дальнейшей работы было решено использовать кожу в получившемся виде: 1-й вариант – сухие, тонкие пластинки после сублимационной сушки, без предварительной зачистки; 2-й вариант – сухие, пропущенные через мельницу пластинки, с предварительной зачисткой.

Определение количества коллагена проводился по методу [8], который основан на определении содержания оксипролина в исследуемых образцах. Также было установлено содержание общего азота и белка. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание оксипролина в коже минтая

Вариант	Содержание, %		Количество оксипролина, мг%	Содержание соединительной ткани (коллагена), % к белку
	Общего азота	Белка		
1	14,66-14,70	91,75	629,98-690,11	55,42-60,61
2	13,80-13,85	86,41	582,87-597,20	54,34-55,88

Как видно из полученных данных, содержание общего азота, белка и оксипролина в образцах без предварительной зачистки немного выше по сравнению с образцами, которые перед этапом ферментной обработки полностью зачищались вручную, что объясняется возможным наличием небольшого остатка прирезей мышечной ткани. Содержание коллагена у опытных образцов примерно одинаковое.

Следующим этапом был подбор параметров ферментативного гидролиза, с целью получения гидролизата плотной гелеобразной консистенцией – для дальнейшего высушивания до порошкообразного состояния.

Первый опыт проводился с сырой промытой кожей при разном гидромодуле. Накопление сухих веществ в процессе гидролиза определялось рефрактометрическим методом, каждые полчаса (температура гидролиза 45°С). В качестве ферментного препарата использовался «Протамекс» с протеолитической активностью 330 МЕ/г, который брался в количестве 0,2% от массы навески. Инактивацию фермента проводили при температуре 80°С в течение 20 мин. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Накопление сухих веществ в процессе ферментативного гидролиза в исходных образцах кожи в зависимости от гидромодуля

Время гидролиза, мин.	Количество сухих веществ, %	
	Вариант 1 Гидромодуль 1:3	Вариант 2 Гидромодуль 1:5
30	7,6	4
60	7,8	4,4
90	8	4,8
120	8	5,4
150	9,6	5,6

Из полученных данных следует, что количество сухих веществ в гидролизатах невысоко, даже при гидромодуле 1:3. Это являлось причиной отсутствия желаемой гелеобразной структуры,

поэтому, использование сырой кожи в качестве сырья для получения гидролизатов посчитали нецелесообразным.

На основании данных результатов было решено провести второй опыт со образцами кожи, подвергшихся предварительной зачистке на этапе промывания, сублимационной сушки и механическому измельчению при тех же параметрах гидролиза.

Таблица 3

Накопление сухих веществ в процессе ферментативного гидролиза сухой кожи в зависимости от гидромодуля

Время гидролиза, мин.	Количество сухих веществ, %	
	Вариант 1 Гидромодуль 1:3	Вариант 2 Гидромодуль 1:5
30	30	20,4
60	33,0	21,0
90	36,0	21,8
120	37,0	23,4
150	41,2	24,0

Результаты (таблица 3) показывают, что процесс накопления сухих веществ идёт значительно активнее. Связано это с тем, что за счет процесса сублимационной сушки содержание воды в опытных образцах значительно ниже (6-9%) в сравнении с промытыми (35-59%).

Также было отмечено, что в начале гидролиза (на первых 60 мин.) консистенция обоих опытных образцов характеризовалась как жидкая гелеобразная субстанция, однако с течением времени плотность уменьшалась и образцы становилась полностью жидкими.

Для подтверждения полученных результатов следующий эксперимент проводился с кожей, без предварительной зачистки, сублимационно высушенной и измельчённой до мелких пластинок. Параметры ферментативного гидролиза аналогичны с прошлыми опытами, за исключением одного образца, в котором гидромодуль был изменён до соотношения сырьё: вода=1:10, для наглядного установления зависимости. Результаты исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4

Зависимость накопления сухих веществ от гидромодуля в процессе гидролиза

Время гидролиза, мин.	Количество сухих веществ, %		
	Вариант 1 Гидромодуль 1:3	Вариант 2 Гидромодуль 1:5	Вариант 3 Гидромодуль 1:10
30	31,2	20,0	10,8
60	32,4	20,8	11,0
90	35,0	22,0	13,0
120	36,6	22,6	15,8
150	39,0	24,2	15,8

Как и следовало ожидать, накопление сухих веществ находится в прямой зависимости от гидромодуля при прочих равных условиях: чем меньше соотношение сырьё:вода, тем быстрее происходит аккумуляирование вещества. Сравнивая данные таблиц 3 и 4 можно сделать вывод, что измельчение кожи через мельницу немного интенсифицирует процесс накопления сухих веществ, за счет образования более мелкой структуры, однако в целом процесс протекает одинаково.

Вывод

По результатам проведенных исследований было установлено, что количество соединительной ткани (коллагена) несущественно зависит от способа первичной обработки, из чего можно заключить, что этап предварительной зачистки кожи от мышечной ткани, хрящей и плавников не является обязательным, что способствует значительному сокращению длительности процесса подготовки кожи. Также отмечено, что несмотря на то, что сублимационная сушка не дала ожидаемого

результата (использовалась с целью получения порошка), её можно использовать как способ консервирования первичного продукта, так и как этап подготовки кожи для проведения дальнейших экспериментов.

Согласно данным, полученным в ходе проведения серии опытов по подбору параметров ферментативного гидролиза, было установлено, что рациональными являются: температура 45 °С, продолжительность 2-3 ч, количество фермента 0,2% от массы сырья, гидромодуль 1:3. В качестве сырья можно рекомендовать использование высушенной кожи минтая. Несмотря на то, что данный способ не позволяет получить ферментативный гидролизат гелеобразной консистенции, его возможно использовать в технологии продуктов питания, в которых по рецептуре предусмотрено использование воды, частично или полностью её заменяя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Российский вылов минтая в 2022 году может достигнуть 1,8 млн тонн // Электрон. дан. Режим доступа URL: <https://rybak-kamchatky.ru/news/3638-rossiiskii-vylov-mintaja-v-2022-godu-mozhet-dostignut-1-8-mln-tonn.html> (дата обращения 03.08.2022).
2. Кизеветтер И.В. Биохимия сырья водного происхождения: Учебник. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 422 с.
3. Чупикова Е.С. Разработка технологий пищевых продуктов их отходов от разделки минтая: автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Владивосток, 2000 – 181 с.
4. Патент РФ 2726109 Тернарная полифункциональная пищевая композиция для продуктов питания специализированного назначения / Зарубин Н.Ю., Кидяев С.Н., Литвинова Е.В., Бредихина О.В. Оpubл. 09.07.2022.
5. Патент SU 1789184 Способ получения пищевой эмульсии / В.Д. Богданов. Оpubл. 23.01.1993.
6. Патент РФ 2391002 Способ приготовления дрожжевого теста для рыбомучных кулинарных изделий / С.А. Пакляченко. Оpubл. 10.06.2010.
7. ГОСТ 7636-85 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. (2010). М.: Россия: Изд-во стандартов. - 129 с.
8. Аналитические методы белковой химии. (Под ред. В.Н. Ореховича). – М.: Изд-во Иностранной литературы, 1963. – 636 с.

INFLUENCE OF PRIMARY TREATMENT OF POLLACK SKIN ON COLLAGEN CONTENT

¹Klipak Marina Borisovna, graduate student

²Slutskaya Tatyana Noevna, Dr. Sc. sciences, professor

^{1,2}FESTFU «Dalrybvuz», Vladivostok, Russia, e-mail: ¹marina.81928@gmail.com

The results of a study of the influence of methods of primary processing of pollock skin on the content of hydroxyproline and connective tissue (collagen) are presented. The output of pure skins is calculated depending on the method of primary processing, the effect of freeze-drying on its texture. It has been established that the content of hydroxyproline and collagen in the studied skins varies slightly depending on the method of processing, which ultimately characterizes pollock skin as a potential source for obtaining collagen and (or) collagen hydrolysates.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЫБНОЙ БЕЛКОВО-МИНЕРАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ И МУЧНЫХ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ

¹Ключко Наталия Юрьевна, канд. техн. наук, доцент,
доцент кафедры пищевой биотехнологии

²Позднякова Дарья Александровна, аспирант

³Ковалева Екатерина Дмитриевна, магистрант

^{1,2,3}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»,
Калининград, Россия, e-mail: ¹natalya.kluchko@klgtu.ru

Решается проблема совершенствования технологий пшеничных галет и ржано-пшеничных хлебцев (краюшек) путем их обогащения белково-минеральной добавкой, полученной путем деструкции мышечной, покровной и костной тканей рыбного сырья и последующем введении в состав теста. Результаты физико-химических исследований показали увеличение количества белка на 47,3 %, минеральных веществ – на 96,3 %. Показатель биологической ценности белка составил 124 %, что характеризует его сбалансированность.

Хлебобулочные и мучные кондитерские изделия для большинства населения являются неотъемлемой частью повседневного питания. В структуре питания современного человека все большее место занимают перекусы, к которым в первую очередь прибегают наиболее мобильные слои населения: школьники, учащаяся молодежь, офисные сотрудники и другие. Рацион их питания, как правило, не соответствует физиологическим потребностям организма. Минздрав России отмечает недостаточное употребление животного белка, дефицит витаминов и минеральных веществ, преобладание углеводно-жирового компонента и животных жиров, избыток простых углеводов [1].

Проведенный нами опрос подростков в возрасте 15-16 лет показал, что большинство их питается 3 раза в день (45%), хотя остаются и те, кто ограничивается 1-2 приемами пищи в день (32%) [2, 3]. Основным перекусом опрошиваемых детей являются фрукты, пицца, бутерброды, булочки и сладости (рис. 1).



Рис. 1. Виды перекусов подростков 15-16 лет

Из рис. 1 видно, что 22% приходится на хлебобулочные и мучные кондитерские изделия (ХиМКИ), которые помимо школы, употребляются в достаточном объеме и дома. В связи с этим

актуально повышать биологическую ценность этих продуктов, как наиболее популярных среди молодежи. ХимКИ – преимущественно углеводный продукт, поэтому целесообразно их обогащение белком, минеральными веществами и витаминами.

В последнее время в качестве основных источников белка при обогащении ХимКИ ученые предлагают использовать как добавки растительного (шрот масличных культур, концентраты и изоляты белков семян сои, подсолнечника, хлопчатника, арахиса, кунжута, фасоли, рапса, картофелепродукты), так и животного происхождения (молоки лососевых видов рыб, сурими, кефирную закваску, молочную сыворотку) [4].

Особый интерес в качестве полноценного белка представляет рыбный белок. Анализ рациона питания подростков, проведенный нами, показал, что рыба, к сожалению, пользуется популярностью только у 17% [2, 3].

Известны работы отечественных ученых Черногорцева А.П., Разумовской Р.Г., Лысовой А.С., Бессмертной И.А. по использованию промытого или ферментированного рыбного фарша в технологии мучных кондитерских изделий [4 - 10], исследования Цибизовой М.Е., Аверьяновой Н.Д. - по влиянию молочной сыворотки на интенсивность частичной дезагрегации белка мышечной ткани рыб [11]. Однако при производстве ХимКИ ранее не использовался способ введения в состав теста рыбной белково-минеральной массы с использованием молочной сыворотки.

Цель настоящей работы заключалась в совершенствовании технологий хлебобулочных и мучных кондитерских изделий путем их обогащения белком рыбы, белково-минеральной добавкой на основе рыбного и молочного сырья.

На начальном этапе работы была исследована возможность обогащения белком рыбы мучных кондитерских изделий (МКИ). В качестве объекта совершенствования рецептуры были выбраны пшеничные галеты. Последние относятся к МКИ слоистой структуры с содержанием массовой доли влаги не более 11%, сахара (по сахарозе в пересчете на сухое вещество) – не менее 11%. Изделия можно рассматривать как снековую продукцию.

При определении вкусовых предпочтений наиболее распространенных рецептов галет путем их пробных выпечек и органолептической оценки позволило нам остановиться на рецептуре галет «Простые», включающая пшеничную муку высшего сорта, воду, разрыхлитель, соль, сахар, подсолнечное масло и крахмал. Последний используется для улучшения реологических свойств теста, органолептических показателей и сохраняемости МКИ.

Анализ литературных данных показал, что ферментализация рыбного фарша приводит к распаду белков мышечной ткани рыб до крупномолекулярных соединений: альбуминов, пептонов, пептидов [5, 6, 10 - 12]. Ферментализация способствует приобретению рыбной белковой массой свойств, необходимых для её использования в качестве наполнителя пищевых продуктов с целью повышения их биологической ценности. После ферментализации может быть получена белково-минеральная добавка (БМД) с реологическими свойствами, которые способствуют лучшему сочетанию его с тестом, приготовленным на основе пшеничной муки при замесе. БМД, полученная таким способом, и введенная в тесто позволит ему обладать хорошей вязкостью, липкостью и соответствующими гидрофильными свойствами.

Для совершенствования рецептуры галет было предложено ввести в состав теста ферментированный рыбный фарш, полученный следующим путем. Мышечную ткань трески балтийской измельчали на куттере и направляли на ферментализацию, который проводили в присутствии воды при гидромодуле фарш : вода как 1 : 1, температуре $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и продолжительности 20 мин. Затем воду удаляли и вводили в тесто.

Для установления оптимальных параметров процесса приготовления пшеничных галет повышенной биологической ценности применяли математическое планирование эксперимента. В качестве варьируемых частных факторов, подлежащих регулированию и оптимизации, использовали количества вносимого крахмала (X_k) и ферментированного рыбного фарша (X_p). Параметром оптимизации математической модели y для повышения объективности результатов исследования, выбран безразмерный обобщенный показатель, объединяющий два частных отклика: пористость и адгезию. Обработка полученных данных позволила рассчитать параметры уравнения, адекватно связывающего обобщенный параметр оптимизации с изменяемыми факторами, которое позволяет прогнозировать качество продукта:

$$y = 0,266x_K^2 + 0,0096x_P^2 - 0,0177x_K x_P - 0,5996x_K - 0,0952x_P + 0,4793$$

Расчет оптимальных значений факторов, а именно содержание крахмала (X_K) – 5,5 г/100 г продукта, рыбного фарша (X_P) – 18 г/100 г продукта, позволил разработать рецептуру пшеничных галет, обогащенных рыбным белком – галеты «Калининградские» (рис. 2).



Рис. 2. Пшеничные галеты, обогащенные рыбным белком «Калининградские»

Органолептическая оценка обогащенных галет показала, что они представляют собой МКИ прямоугольной формы, с гладкой, без вздутий и трещин поверхностью, с равномерным цветом от соломенно-желтого до светло-коричневого, вид в изломе – слоистый, пропеченный, с равномерной пористостью, без вздутий, закала и следов непромеса, вкус и запах - приятные, свойственные данному виду изделий, рыбные оттенки практически не выражены. Физико-химические показатели представлены в табл. 1, из которой видно, что содержание белка в обогащенных галетах увеличилось на 47,5%, минеральных веществ – на 38,8%. Полученные результаты говорят о перспективности работы и требуют дальнейших исследований.

Таблица 1

Физико-химические показатели качества галет

Наименование показателя	Галеты «Простые» (контрольный образец)	Галеты «Калининградские» (экспериментальный образец)
Массовая доля влаги, %	9,55	10,05
Массовая доля белка, %	10,15	14,97
Массовая доля жира, %	1,80	1,60
Массовая доля углеводов, %*	77,24	71,95
Массовая доля минеральных веществ, %	1,26	1,43
Щелочность, град.	0,6	0,6

* данные получены расчетным путем

Другим направлением исследований, проводимых на кафедре пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «КГТУ», является совершенствование технологии хлебобулочного изделия (ХБИ) – ржано-пшеничных хлебцев [3]. Введение в состав теста рыбной белковой добавки позволило получить продукт с привлекательными органолептическими свойствами, исследование химического состава показало увеличение белка, но не давало существенного прироста минеральных веществ. Вследствие этого нами было предложено использовать не только мышечную ткань рыбы, но и её опорно-каркасные и покровные ткани. Последние являются источником кальция, фосфора, белка коллагена, которые являются строительными компонентами для растущего организма подростка,

укрепления его опорно-двигательного аппарата. В табл. 2 представлены результаты исследований химического состава тушки трески балтийской (*Gadus morhua*).

Таблица 2

Общий химический состав тушки трески балтийской (*Gadus morhua*)

Вид рыбы	Массовая доля, %				Энергетическая ценность, кДж/100 г
	Влага	Белок	Жир	Зола	
Тушка трески	78,65	14,15	2,75	4,45	81,43

Видно, что фарш из тушки трески балтийской по массовой доле белка находится на уровне наиболее используемых морских видов рыб. По содержанию белка треску включают в группу белковых рыб (15-20%), а по содержанию жира – к диетическим (нежирным) (0,1-4%), что говорит о его высокой биологической ценности и перспективе использования в технологии хлебобулочных изделий.

Экспериментально доказано высокое содержание кальция (табл. 3) в тушке трески, что обусловлено его высоким содержанием в костях рыбы, в том числе позвоночной. Соотношение Ca : P составляет 1 : 0,6, что потенциально благоприятно для организма человека.

Таблица 3

Содержание кальция и фосфора в тушке трески балтийской (*Gadus morhua*)

Наименование объекта	Кальций, мг/кг	Фосфор, мг/кг
Тушка трески	1555,2	860

Для размягчения рыбных тканей применяли кислотнo-ферментативный гидролиз в молочной сыворотке (подсырной). Последняя отличается низкой калорийностью и высокой биологической ценностью: содержит молочный белок, витамины группы B, а также комплекс таких минеральных соединений как калий, натрий, кальций, магний, железо и другие.

Для оптимизации процесса дезагрегации рыбного сырья тушку трески пропускали через волчок от 1 до 3 раз. Время дезагрегации варьировали от 2 до 4 часов. Гидромодуль «рыбный фарш : молочная подсырная сыворотка» составил 1:1 при температуре 20-22⁰С. рН начальное рыбно-молочной смеси составил 5,8 – 6,0, что близко к оптимальному значению работы катепсинов мышечной ткани рыбного сырья, молочнокислой микрофлоры и химозина – сычужного фермента, остающегося в сыворотке после получения сыра.

Реализация плана эксперимента и обработка полученных данных позволила рассчитать уравнение, адекватно связывающее обобщенный параметр оптимизации с изменяемыми факторами, которое позволяет максимально деструктировать белково-минеральную массу при сохранении привлекательных органолептических показателей. Оптимальные параметры составили: 2,05 раза – степень измельчения рыбного сырья, принимаем соответственно 2 раза, 3,92 ч – продолжительность дезагрегации, принимаем 4 ч.

Полученную белково-минеральную массу апробировали при изготовлении ржано-пшеничных хлебцев, которую вводили непосредственно при замесе теста. Выпеченный готовый продукт представлял собой хлебобулочное изделие правильной формы, без вмятин, с ровными краями, поверхность гладкая, без вздутий и трещин, цвет – равномерный от светло-серого до светло-коричневого, состояние мякиша – хорошо пропеченное, с равномерной структурой, без признаков непромеса, вкус и запах – приятные с неярко выраженными рыбными оттенками.

Дегустаторами проведена оценка контрольных и экспериментальных образцов продукции (соответственно без и с введением белково-минеральной добавки) профильным методом по интенсивности с использованием разработанных характеристик. Индивидуальные оценки экспертов заносились в дегустационные листы, после чего был построен профиль вкуса данных образцов хлебобулочных изделий (рис. 3).

Физико-химические показатели качества контрольных и экспериментальных образцов хлебо-булочных изделий представлены в табл. 4. Результаты исследований показали увеличение количества белка на 47,3%, минеральных веществ – на 96,3%.

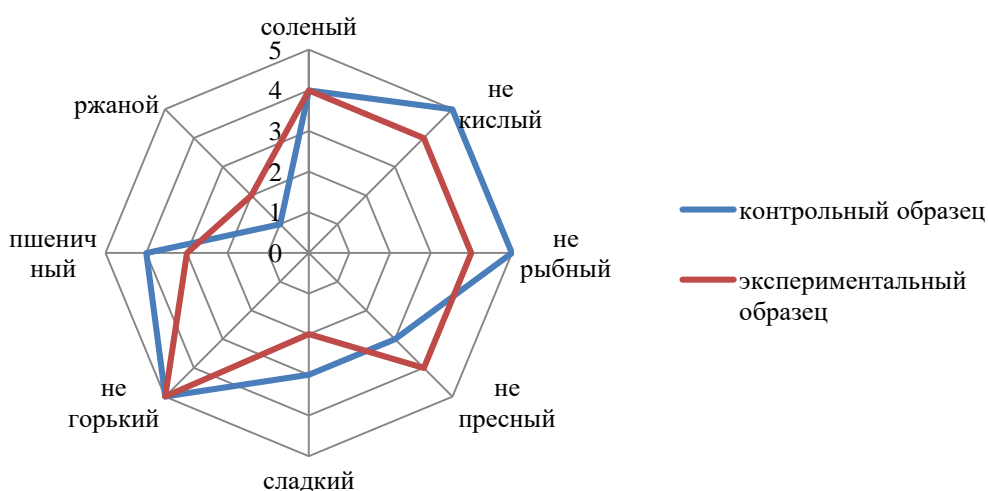


Рис. 3. Профиль вкуса хлебцев

Таблица 4

Физико-химические показатели экспериментальных и контрольных образцов хлебцев

Наименование показателя	Экспериментальные образцы (с белково-минеральной добавкой)	Контрольные образцы (без белково-минеральной добавки)
Массовая доля влаги, %	31,10	31,00
Массовая доля белка, %	15,10	10,25
Массовая доля жира, %	0,70	0,85
Массовая доля углеводов, %*	50,45	56,55
Массовая доля минеральных веществ, %	2,65	1,35
Кислотность, рН	0,2	0,1
Энергетическая ценность продукта, ккал*	262,99	265,65

*данные полученные расчетным путем

Для оценки хранимоспособности продукции были проведены микробиологические испытания готового продукта, а также безопасности основного и вспомогательного сырья. В результате исследований было установлено, что необходимо тщательно контролировать сырьевые компоненты рецептуры, в особенности обсеменённость фарша из тушки трески и сыворотки. Также был установлен гарантированный срок хранения для обогащенных хлебцев - 72 часа при температуре не ниже 6⁰С, также возможно хранение при температуре -18⁰С в течении 3 недель с последующим разогревом в духовке при 180⁰С в течении 5 минут.

Установлено, что введение в состав инновационных хлебобулочных и мучных кондитерских изделий рыбного белково-минеральной добавки повышает их биологическую ценность при сохранении привлекательных органолептических показателей. Разработана технология пшеничных галет, обогащенных рыбным белком, с применением метода математического планирования определены оптимальные параметры рецептуры, доказано увеличение содержание массовой доли белка на 47,5%, минеральных веществ – на 38,8%. Разработана технология ржано-пшеничных хлебцев, обогащенных белково-минеральной добавкой, полученной путем частичной дезагрегации тушки трески в молочной сыворотке (подсырной), происходящей под действием ферментов мышечной ткани рыбы, сычужного фермента и молочной кислоты в течение 4 ч при естественном рН реакционной смеси равном 5,9 ±0,1, гидромодуле 1:1 и температуре 22±2⁰С. Показано, что обогащение ржано-пшеничных хлебцев белково-минеральной композицией повышает содержание белка на

70,2%, минеральных веществ – на 60,9%, уменьшает количество углеводов – на 13,3%. Содержание кальция в обогащенных хлебах по сравнению с традиционной продукцией больше в 2,2 раза, калия – в 1,2 раза, магния – в 1,7 раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коденцова В. М., Громова О. А., Макарова С. Г. Микронутриенты в питании детей и применение витаминно-минеральных комплексов // Педиатрическая фармакология. 2015. Т.12, № 5. С. 6
2. О возможности использования продуктов гидролиза коллагена гидробионтов в технологии хлебобулочных изделий / Ключко Н. Ю. [и др.] // Наука и образование. 2021. № 4(2). С. 1 - 8.
3. Ключко Н.Ю. Исследование по совершенствованию технологии хлебобулочного изделия, обогащенного рыбной белково-минеральной добавкой / Н.Ю. Ключко, Д.А. Позднякова // Известия КГТУ. 2022, № 66, С. 103 – 112.
4. Кубанкова Г.В. Совершенствование технологии хлеба и мучных кондитерских изделий путем использования белково-углеводной муки из вторичного соевого сырья: дис. на соиск. уч. степ. канд. техн. наук/Н.Д.:05.18.15/ Кубанкова Галина Викторовна. - Владивосток., 2021. - 201 с.
5. Черногорцев А.П. Переработка мелкой рыбы на основе ферментированного сырья / А.П. Черногорцев. – М., 1973. – 152 с.
6. Махнач Е.В., Бессмертная И.А. Разработка технологии функционального продукта из пшеничной муки, обогащенного рыбным белково-минеральным наполнителем // Научный журнал НИУ ИТМО. Сер. Процесс и аппараты пищевых производств. - 2014. - №1.
7. Skipping breakfast and a meal at school: its correlates in adiposity context. report from the ABC of healthy eating study of polish teenagers / L. Wadolowska et al. // Nutrients. 2019. N. 11(7), P. 1563
8. The effect of different levels of protein concentrate silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) to the profiles mineral production test breads / S. Ghaffari et al. // Journal of Food Science and Technology (Iran). 2021. N. 18(111), s. 117-129
9. Electronic sensory assessment of bread enriched with cobia (*Rachycentron canadum*) / G.A. Fagundes et al. // Journal of Food Process Engineering. 2021. P. 1458
10. Fish support-frame and integumentary tissues in food biotechnology / E S Zemlyakova et al. // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 689 012035. 2021, available at: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/689/1/012035/pdf>
11. Цибилова М.Е. Научное обоснование и методология переработки водных биологических ресурсов Волжско-Каспийского рыбохозяйственного бассейна: дис. на соиск. уч. степ. доктора техн. наук/Н.Д.:05.18.04/ Цибилова Мария Евгеньевна. - Астрахань, 2014. - 403 с.
12. Ершов П. С. Сборник рецептур на хлеб и хлебобулочные изделия. СПб, 2010. 191 с.

THE USE OF FISH PROTEIN-MENERAL COMPOSITION FOR THE ENRICHMENT OF BAKERY AND FLOUR CONFECTIONERY PRODUCTS

¹Klyuchko Nataliya Yurievna, PhD, Associate Professor

²Pozdnyakova Dariya Alexandrovna, graduate student

³Kovaleva Ekaterina Dmitrievna, student

^{1,2,3}FSBEI HE "Kaliningrad state technical university",
Kaliningrad, Russia, e-mail: ¹natalya.kluchko@klgtu.ru

The article solves the problem of improving the technologies of wheat biscuits and rye-wheat loaves (edges) by enriching them with a protein-mineral additive obtained by the destruction of muscle, integumentary and bone tissues of fish raw materials and subsequent introduction into the dough. The results of physico-chemical studies showed an increase in the amount of protein by 47.3 %, mineral substances – by 96.3 %. The indicator of the biological value of the protein was 124 %, which characterizes its balance.

ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ ЭКСТРАКЦИИ И СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОЛЬХИ СЕРОЙ (*ALNUS INCÁNA*)

¹Ларина Виктория Викторовна, мл. научн. сотрудник
лаборатории микробиологии и биотехнологии, ассистент

²Бахтиярова Алина Халимовна, студентка

³Бабич Ольга Олеговна, д-р техн. наук, директор НОЦ «Прикладная биотехнология»

^{1,2,3}ФГБОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта»,
Калининград, Россия, e-mail: ¹surinac@mail.ru; ²bakhtiarova.allina@yandex.ru;

³ООBabich@kantiana.ru

*Биологически активные вещества фенольной природы, содержащиеся в биомассе ольхи серой (*Alnus Incána*), способны оказывать положительное влияние на организм человека, в том числе антиоксидантное и противомикробное действие. В работе были подобраны оптимальные параметры экстракции ольхи серой (*Alnus Incána*), проведён скрининг антиоксидантной активности и исследован метаболомный состав экстрактов. Метанольный экстракт ольхи серой имел наибольший тотальный выход и проявил наибольшую антиоксидантную активность. В его составе были обнаружены рекордные количества эллаговой кислоты, а также идентифицированы галловая и 3,4-дигидроксibenзойная кислоты. Этот экстракт был разделён на фракции, которые были идентифицированы и исследованы на биологическую активность.*

Введение

С возрастом в организме человека наблюдается интенсификация окислительных процессов, что приводит к накоплению окислительного стресса и, как следствие, возникновению патологических изменений, ускоренному старению, усугублению течения заболеваний [1]. Чтобы препятствовать этому, необходимо включить в рацион функциональные продукты питания и биодобавки, содержащие антиоксиданты. Уже известные лекарственные растения представляют особый интерес как источники вторичных метаболитов с антиоксидантной и противомикробной активностью.

Ольха серая активно используется в народной медицине и, согласно литературному описанию, содержит БАВ (биологически активные вещества) фенольной природы с целым спектром полезных свойств [2]. Отвары шишек этого растения оказывают вяжущее, противовоспалительное, кровоостанавливающее и противомикробное действие. Из них также получают препарат Альтан, обладающей противомикробным действием относительно грамотрицательной микрофлоры [3]. Поэтому целью данной работы стал подбор параметров экстракции ольхи серой и скрининг антиоксидантного потенциала ее экстрактов. А также деление наиболее активного экстракта и выделение БАВ в составе фракций, исследование биологической активности отдельных фракций.

Материалы и методы

1.1 Получение экстрактов

На первом этапе проводился подбор параметров экстракции ольхи серой (*Alnus incána*). Для этого получили 3 вида экстрактов: метанолом по методу Сокслета в течение 6 часов (11 циклов); этилацетатом по методу Сокслета в течение 6 часов (11 циклов); мацерацией в очищенной воде на кипящей водяной бане в течение 30 мин. и настаиванием в течение 10 минут. Метод экстракции на аппарате Сокслета был выбран как способ количественного извлечения компонентов из растительного сырья, что также обуславливало и время экстракции: спустя 6 часов реакции методом тонкослойной хроматографии на пластинах DC-Fertigfolien Alugram SIL G/UV₂₅₄ (сорбент – силикагель)

было установлено отсутствие извлечения компонентов растений в новой порции экстракта. Этилацетат позволяет получить растительные экстракты, содержащие полифенолы, в том числе флавонолы и сапонины [4,5], обладающие антиоксидантной и противовоспалительной активностью [6]. Метанол также является подходящим растворителем для экстракции антиоксидантов, таких как полифенолы [7].

1.2 Скрининг образцов экстрактов растений *in vitro* на предмет антиоксидантного действия

Антиоксидантную активность (АОА) экстрактов растительных образцов определяли по способности улавливать свободные радикалы DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразила) и ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоной кислоты), а также по восстанавливающей силе при взаимодействии с комплексом Fe (III)-2,4,6-трипиридил-*s*-триазин (FRAP). При определении антиоксидантной активности по методу DPPH 20 мкл растительного экстракта или стандартный раствор смешивали с 300 мкл свежеприготовленного 0,1 мМ раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Уменьшение оптической плотности по сравнению с контролем (используемый для экстракции растворитель) регистрировали при 515 нм. При определении антиоксидантной активности по методу ABTS предварительно готовили раствор ABTS-радикала. ABTS-радикал генерировали смешиванием аликвот 7,0 мМ раствора ABTS и 2,45 мМ раствора персульфата калия. Раствор выдерживали в течение 16 часов в темном месте при комнатной температуре. Для проведения реакции к 300 мкл подготовленного раствора катион-радикала ABTS^{•+} добавляли 20 мкл растительного экстракта или стандарта. Оптическую плотность измеряли при 734 нм после инкубации смеси в течение 15 мин при 37 °С в темноте. В качестве холостой использовалась проба с ABTS-реактивом и соответствующим растворителем, используемым для экстракции. Для определения восстанавливающей силы экстрактов использовали свежеприготовленный реактив FRAP, приготовленный смешиванием 10 частей 0,3 М ацетатного буфера (рН 3,6), одной части 10 мМ раствора 2,4,6-трипиридил-*s*-триазина в 40 мМ HCl и одной части водного 20 мМ раствора хлорида железа FeCl₃×6H₂O. Реакция запускалась смешиванием 300 мкл FRAP-реактива и 20 мкл исследуемого экстракта или раствора стандарта. Время реакции составляло 10 мин при 37 °С в темноте. Оптическую плотность измеряли при 593 нм. В качестве холостой использовалась проба с FRAP-реактивом и соответствующим растворителем, используемым для экстракции. При измерении антиоксидантной активности с использованием DPPH, ABTS и FRAP методов в качестве стандартного раствора использовали растворы Тролокса (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновой кислоты) известной концентрации. Результаты анализов выражены в мкмоль эквивалента Тролокса на грамм сухой массы растений (мкмоль эквивалентов Тролокса/г).

1.3. Метаболомный анализ приготовленных экстрактов – получение характеристик фотохимические профили

В полученных экстрактах ольхи серой изучали содержание вторичных метаболитов фенольной природы методом ВЭЖХ. Процесс вели на хроматографе LC-20AB «Shimadzu» Prominence с бинарным насосом. Диодно-матричный детектор SPD-M20A. Колонка Zorbax 300SB-C18 4.6*250mm 5µm (Agilent). Разделение проводили при температуре 40 °С в режиме градиентного элюирования. Подвижная фаза: элюент А – 0,1% ТФУ в бидистиллированной воде, В – ацетонитрил. Скорость потока 1 мл/мин, аналитическая длина волны – 254, 280 и 325 нм.

Идентификацию компонентов проводили по временам удерживания и спектрам индивидуальных стандартных веществ.

1.4 Фракционирование экстракта ольхи серой (*Alnus Incána*)

С целью фракционирования для каждого растения отбирались экстракты с наибольшей биологической активностью. Разделение проводили на препаративном хроматографе BUCHI PURE C-850 в режиме flash, колонка FP ECOFLEX Si 40g, детекторы ELSD и UV (254 нм и 280 нм). Градиентный режим разделения подбирался на основе данных тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ-анализа.

1.5 Исследование биологической активности фракций экстракта ольхи серой (*Alnus Incána*)

Далее исследовалась биологическая активность фракций, полученных разделением метанольного экстракта ольхи серой (*Alnus Incána*). На этом этапе изучалась антиоксидантная активность фракций (методика описана в пункте 1.2), а также их противомикробное действие. Противомикробная активность фракций была изучена диско-диффузионным методом. Для исследования использовали 4 штамма микроорганизмов: грамположительные бактерии (*Bacillus Subtilis*) и грамотрицательные бактерии (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*) на агаризованной среде LB, а также дрожжеподобные грибы рода *Candida albicans* на агаризованной среде Рингера. Концентрация микробной суспензии составляла $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Диаметр дисков составлял 6 мм, а толщина слоя агара – $4,0 \pm 0,5$ мм. В качестве сравнения использовали канамицин концентрацией 50 мкг/диск (для бактерий) и флуконазол 500 мкг/диск (для дрожжеподобных грибов). Проводили 3 параллельных измерения. За результат измерения принимали среднее значение.

Результаты и обсуждение

2.1. Антиоксидантная активность образцов полученных экстрактов

Результаты скрининга образцов экстрактов на предмет их антиоксидантной активности (АОА) представлены в таблице 1.

Таблица 1

Антиоксидантная активность экстрактов ольхи серой (*Alnus Incána*)

Метод экстракции	Мкмоль экв. тролокса/г		
	ABTS	DPPH	FRAP
Метанолом по методу Сокслета	1094,02±14,53	584,45±35,31	471,63±7,06
Этилацетатом по методу Сокслета	103,90±0,61	48,12±2,95	36,81±1,06
Мацерация очищенной водой	579,07±41,87	275,89±23,55	378,69±31,03

Наибольшую активность по отношению к радикалам ABTS, DPPH и FRAP продемонстрировал экстракт, полученный метанолом по методу сокслета, она составила 1094,02 мкмоль экв. тролокса/г, 584,45 мкмоль экв. тролокса/г и 471,63 мкмоль экв. тролокса/г соответственно. Меньшую активность показал водный экстракт ольхи серой: 579,07 мкмоль экв. тролокса/г, 275,89 мкмоль экв. тролокса/г и 378,69 мкмоль экв. тролокса/г. Наименьшие значения наблюдались у этилацетатного экстракта, его АОА составила всего 103,90 мкмоль экв. тролокса/г по отношению к ABTS, 48,12 мкмоль экв. тролокса/г относительно DPPH и 36,81 мкмоль экв. тролокса/г при взаимодействии с FRAP.

2.2. Метаболомный состав полученных экстрактов

Основным компонентом экстрактов шишек ольхи была эллаговая кислота (рисунки 1 – 3), показывая рекордные количества (от 10,994 г/кг до 44,883 г/кг). Кроме того, во всех экстрактах была обнаружена галловая кислота (от 0,141 до 2,972 г/кг), а в этилацетатном и метанольном экстрактах были обнаружены следовые количества 3,4-дигидроксибензойной кислоты.

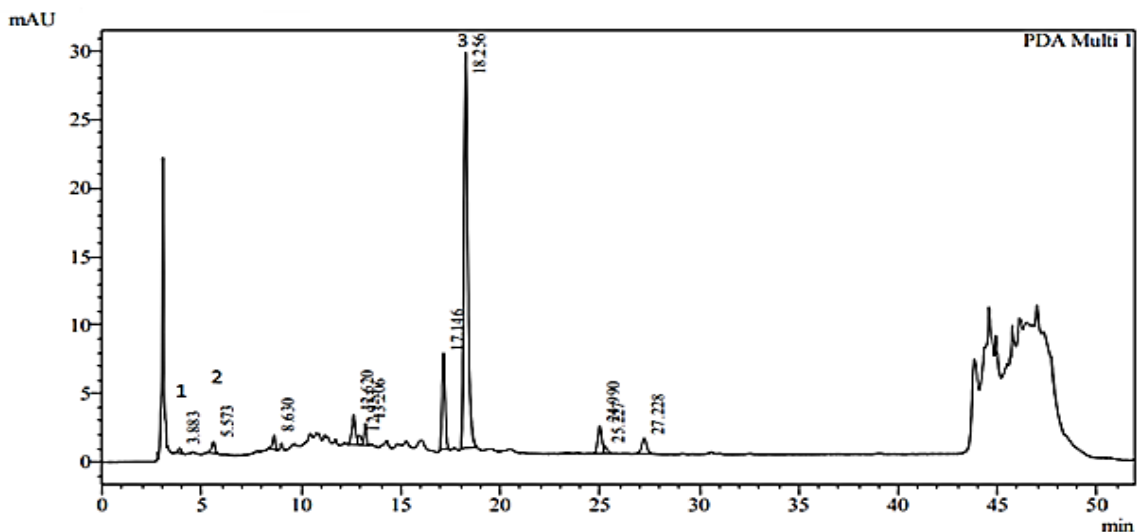
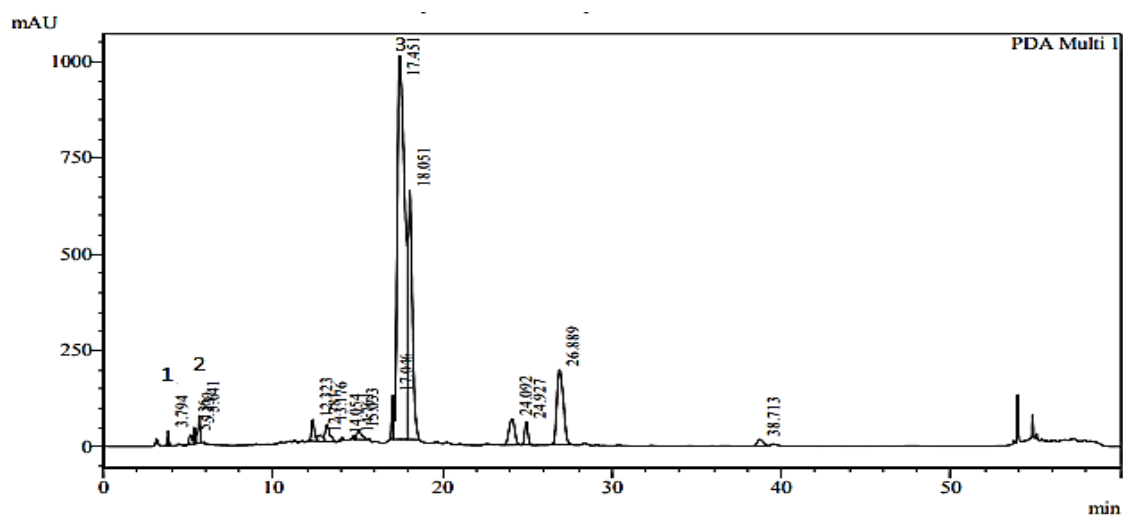
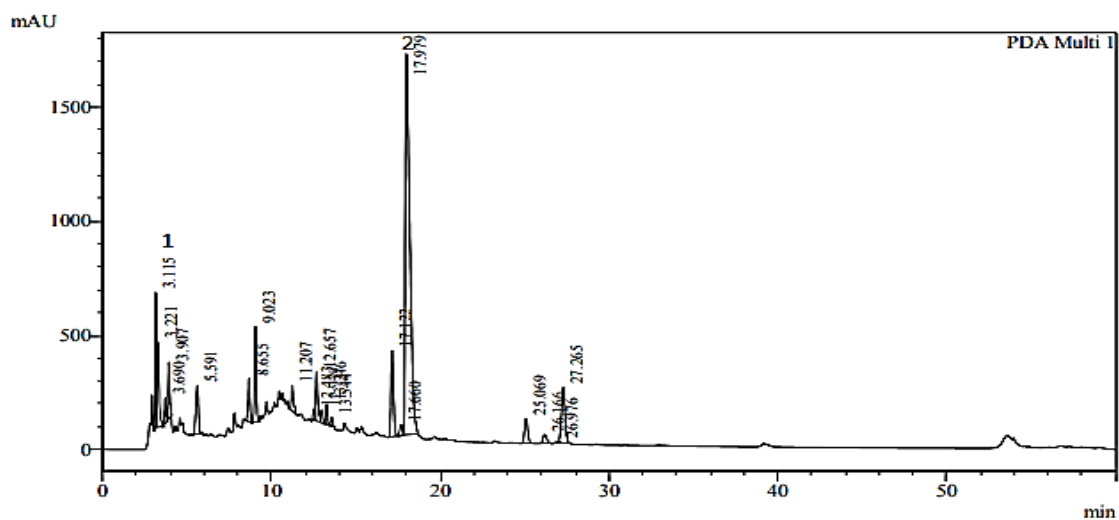


Рис. 1. Хроматограмма ВЭЖХ метанольного экстракта ольхи серой (*Alnus Incana*)
1 – галловая кислота, 2 – 3,4-дигидроксibenзойная кислота, 3 – эллаговая кислота



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Рис. 2. Хроматограмма ВЭЖХ этилацетатного экстракта ольхи серой (*Alnus Incana*)
1 – галловая кислота, 2 – 3,4-дигидроксibenзойная кислота, 3 – эллаговая кислота



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Рис. 3. Хроматограмма ВЭЖХ водного экстракта ольхи серой (*Alnus Incana*)
1 – галловая кислота, 2 – эллаговая кислота

2.3. Результаты фракционирования метального экстракта ольхи серой (*Alnus Incána*)

Для фракционирования был выбран экстракт ольхи серой (*Alnus Incána*), полученный метанолом по методу сокслета, т.к. он показал наибольшую антиоксидантную активность.

В процессе деления было получено 9 фракций, их массы были определены гравиметрически, идентификацию фракций производили на ВЭЖХ (таблица 2). Фракции 1-3 не были идентифицированы, для уточнения структуры будут проведены дополнительные исследования.

Таблица 2

Состав фракций (мг БАВ на 1 кг растительного сырья), полученных при разделении метанольного экстракта ольхи серой (*Alnus Incána*)

Номер фракции	Выход фракции, г/кг	Идентифицированные БАВ	Выход БАВ, мг/кг
1	0,29	не определено	—
2	0,14	не определено	—
3	0,69	не определено	—
4	0,78	эллаговая к-та	63,74
		производные эллаговой к-ты (сумма)	45,89 ¹
		галловая к-та	49,39
5	1,69	эллаговая к-та	514,61
		производные эллаговой к-ты (сумма)	28,88 ¹
		галловая к-та	3,22
6	7,98	эллаговая к-та	3568,15
		производные эллаговой к-ты (сумма)	415,27 ¹
7	7,79	эллаговая к-та	2122,11
		производные эллаговой к-ты (сумма)	200,74 ¹
8	0,49	эллаговая к-та	154,82
		производные эллаговой кислоты (сумма)	18,09 ¹
9	4,74	эллаговая к-та	958,43
		производные эллаговой кислоты (сумма)	110,54 ¹

¹ посчитано на эллаговую кислоту

2.4 Биологическая активность фракций

Далее фракции были исследованы на антиоксидантную и противомикробную активности. Результаты скрининга АОА обобщены в таблице 3. Из неё видно, что наименьшей активностью обладают фракции 1-3: относительно радикалов АВТС значения варьировались от 23 до 655 мкмоль экв. Тролокса/г, DPPH – от 14 до 449 мкмоль экв. Тролокса/г и FRAP – от 6 до 250 мкмоль экв. Тролокса/г. Наибольшие значения АОА принадлежат фракции 8, способность улавливать радикалы АВТС выражалась в 12885 мкмоль экв. Тролокса/г, DPPH – 5728 мкмоль экв. Тролокса/г, а FRAP – 6683 мкмоль экв. Тролокса/г. Остальные фракции тоже показали достаточно высокую активность при взаимодействии со свободными радикалами, в реакции с АВТС значения варьировались от 2384 до 6800 мкмоль экв. Тролокса/г, с DPPH – от 792 до 4308 мкмоль экв. Тролокса/г, а с FRAP от 1176 до 3501 мкмоль экв. Тролокса/г.

Таблица 3

Результаты исследования антиоксидантной активности фракций метанольного экстракта ольхи серой (*Alnus Incána*)

Номер фракции	Антиоксидантная активность, мкмоль экв. Тролокса/г		
	АВТС	DPPH	FRAP
1	23±4	14±2	6±1
2	457±41	160±11	86±6
3	655±52	449±24	250±21
4	2847±131	792±40	1816±68

Номер фракции	Антиоксидантная активность, мкмоль экв. Тролокса/г		
	ABTS	DPPH	FRAP
5	2384±113	1171±60	1176±37
6	4748±218	2132±106	2452±92
7	6800±312	4308±215	3501±131
8	12885±591	5728±286	6683±250
9	4012±184	979±49	2031±76

Фракции 1-3 были исследованы на наличие противомикробного действия. Было установлено, что наибольшую активность проявляла фракция 3, зона задержки роста *E. Coli* и *P. Aeruginosa* составила 9 мм, *B. Subtilis* – 12 мм. Фракция 2 проявляла активность в отношении *B. Subtilis*, зона задержки роста составила 7 мм, однако она не превышала ингибирующую активность канамицина в количестве 50 мг (20 мм). Фракция 1 не обладала бактерицидными свойствами. Фунгицидную способность не проявила ни одна фракция.

Вывод

Таким образом, в ходе данной работы были подобраны оптимальные параметры экстракции растения ольха серая (*Alnus Incána*). При экстракции метанолом по методу Сокслета наблюдались высокая антиоксидантная активность и наибольшее количество БАВ в составе. Основным компонентом была эллаговая кислота, которая помимо антиоксидантного и противомикробного действия обладает большим спектром биологической активности. Например, проявляет кардиопротекторные, гепатопротекторные, противоопухолевые свойства и гипотензивный эффект [8]. При разделении экстракта удалось получить фракции этого соединения и его производных. Фракции проявили высокую способность к ингибированию радикального окисления и бактерицидные свойства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 21-76-10055).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин и др. – Новосибирск: Издательство АРТА, 2008. – 284 с.
2. Diarylheptanoids from *Alnus glutinosa* Bark and Their Chemoprotective Effect on Human Lymphocytes DNA / Novakovic M., Stankovic M., Vuckovic I., Todorovic N., Trifunovic S., Tešević V., Vajs V., Milosavljevic S. // *Planta Med.* - 2013. - С. 499–505.
3. Коноплёва М. М. Изучение диагностических признаков двух видов ольхи / Коноплёва М. М., Гурин С. А., Мушкина О. В. // *Вестник фармации.* - 2006. - №2. - С. 1-6.
4. Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material / Ligor M., Ratiu I. A., Kielbasa A., Al-Suod H., Buszewski B. // *Electrophoresis.* - 2018. - №39. - С. 1860-1874.
5. Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace/ Pintać D., Majkić T., Torović L., Orčić D., Beara I., Simin N., Lesjak M. // *Industrial Crops and Products.* - 2018. - №111. - С.379-390.
6. *Scrophularia lucida* L. as a valuable source of bioactive compounds for pharmaceutical applications: In vitro antioxidant, anti-inflammatory, enzyme inhibitory properties, in silico studies, and HPLC profiles / Zengin, G., Stefanucci A., Rodrigues M. J., Mollica A., Custodio L., Aumeeruddy M. Z., Mahomoodally M. F. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2019. - №162. - С.225-233.
7. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review / Giacometti J., Kovačević D. B., Putnik P., Gabrić D., Bilušić T., Krešić G., Jambrak A. R. // *Food research international.* – 2018. - №113. - С. 245-262.

SELECTION OF EXTRACTION PARAMETERS AND SCREENING OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALNUS GRAY (ALNUS INCÁNA)

¹Larina Viktoria Viktorovna, junior researcher, assistant

²Bakhtiarova Alina Khalimovna, student

³Babich Olga Olegovna, D.Sc. (Technology), director of educational and research centre "Applied biotechnology"

^{1,2,3}Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia,

e-mail: ¹surinac@mail.ru; ²bakhtiarova.allina@yandex.ru; ³OOBabich@kantiana.ru

Biologically active substances of phenolic nature contained in Alnus Incána biomass can have a positive effect on the human body, including antioxidant and antimicrobial effects. In this work, the optimal parameters of Alnus Incána extraction were selected, antioxidant activity screened and the metabolomic composition of extracts was studied. Methanollic extract of Alnus Incána had the greatest total yield and showed the greatest antioxidant activity. It contains record amounts of ellagic acid, as well as gallic and 3,4-dihydroxybenzoic acids. This extract was divided into fractions that have been identified and studied for biological activity.

УДК 577.19:615.32

ПОЛУЧЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БАВ И ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭКСТРАКТОВ *MELILOTUS OFFICINALIS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ PH ЭКСТРАГЕНТА

¹Ларина Виктория Викторовна, мл. научн. сотрудник лаборатории микробиологии и биотехнологии, ассистент

²Чупахин Евгений Геннадьевич, канд. хим. наук, доцент

³Бабич Ольга Олеговна, д-р техн. наук, директор НОЦ «Прикладная биотехнология»

⁴Бахтиярова Алина Халимовна, студентка

^{1,2,3,4}ФГБОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта»,

Калининград, Россия, e-mail: ¹surinac@mail.ru; ²chupakhinevgen@gmail.com;

³OOBabich@kantiana.ru; ⁴bakhtiarova.allina@yandex.ru

*В ходе работы получены экстракты донника лекарственного (*Melilotus officinalis*) тремя видами экстрагентов: метанолом, метанольным раствором трифторуксусной кислоты (ТФУ) и метанольным раствором гидроксида натрия. Наибольший тотальный выход наблюдался для кислого экстракта. Идентифицированы такие фенольные компоненты, как 3,4-дигидроксибензойная кислота, п-кумаровая кислота, гиперозид или рутин, кверцетин-3D-глюкозид, лютеолин-7-глюкозид, астрагалин, розмариновая кислота, акацетин, апигенин-7-O-глюкозид, цикориевая кислота, катехин и кафтаровая кислота. Из кислого экстракта было получено индивидуальное БАВ, показывающее небольшие значения антиоксидантной активности (АОА), а также противомикробное действие в отношении *Bacillus subtilis*.*

Введение

Донник лекарственный (*M. officinalis*) – ценное лекарственное растение. Его отвары используются для лечения проблем с желудком, заболеваний печени, простудах, воспалении придатков

матки [1]. Кроме того, *M. officinalis* используется как успокаивающее средство при различных болях, неврозе, слабости памяти и истерии. Кумарин донника подавляет работу центральной нервной системы, обладает обезболивающим, противосудорожным, противовоспалительным и противоатеросклеротическим действием [2]. Известны случаи использования отвара донника в составе комплексной терапии при лечении лейкемии с целью улучшения кроветворной функции [3]. Целью данной работы было исследование фитохимического состава экстрактов донника, подбор оптимальных параметров его экстракции и исследование индивидуальных БАВ, выделенных из этого растения, на биологическую активность.

Материалы и методы

1.1. Получение экстрактов

Экстракцию проводили тремя способами: метанолом по методу Сокслета (8 часов, 15 циклов); 0,1 н метанольным раствором гидроксида натрия методом мацерации (рН=12,5) (8 часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании, модуль экстракции 1 : 40); 0,1 н метанольным раствором трифторуксусной кислоты (ТФУ) методом мацерации (рН=1,2) (8 часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании, модуль экстракции 1 : 40).

1.2. Тотальный выход экстрактов

Для определения тотального выхода экстрактов растворитель выпаривали на вакуумном ротационном испарителе. Массу экстракта определяли гравиметрически. Расчеты проводили по формуле:

$$T = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где m_2 – масса экстракта после выпаривания растворителя; m_1 – масса растения.

1.3. Определение содержания вторичных метаболитов фенольной природы в экстрактах

Метаболомный анализ проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20AB «Shimadzu» Prominence с бинарным насосом. Диодно-матричный детектор SPD-M20A. Колонка Zorbax 300SB-C18 4.6*250mm 5 μ m (Agilent). Разделение проводили при температуре 40 °С в режиме градиентного элюирования. Подвижная фаза: элюент А – 0,1% ТФУ в бидистиллированной воде, В – ацетонитрил. Скорость потока 1 мл/мин, аналитическая длина волны – 254, 280 и 325 нм. Идентификацию компонентов проводили по временам удерживания и спектрам индивидуальных стандартных веществ.

1.4. Выделение индивидуальных БАВ

С целью получения (выделения) индивидуальных БАВ из *M. officinalis* экстракты фракционировали в стеклянной хроматографической колонке. В качестве сорбента использовали силикагель. Элюирование вели в градиентном режиме в системе хлористый метилен : метанол с градиентом 0 – 100 %. Из кислого и щелочного экстракта предварительно делали вытяжки хлористым метиленом. Выход БАВ определялся гравиметрически после упаривания в лиофильной сушке.

1.5. Антиоксидантная активность БАВ

Антиоксидантную активность БАВ определяли тремя методами: по способности улавливать свободные радикалы DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразила) и ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты), а также по восстанавливающей силе при взаимодействии с комплексом Fe (III)-2,4,6-трипиридил-s-триазин (FRAP) согласно [4] с некоторыми модификациями.

1.6. Противомикробная активность БАВ

Противомикробную активность БАВ изучали диско-диффузионным методом относительно 4 штаммов микроорганизмов: грамположительных (*B. subtilis*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), а также дрожжеподобных грибов рода *Candida albicans*. Концентрация микробной суспензии составляла $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Диаметр дисков составлял 6 мм, а толщина слоя агара – $4,0 \pm 0,5$ мм. В качестве сравнения использовали канамицин концентрацией 50 мкг/диск (для бактерий) и флуконазол 500 мкг/диск (для дрожжеподобных грибов). В качестве контролей использовали смесь, состоящую из 1 %-ной трифторуксусной кислоты (31 %) и ацетонитрила (69 %), в которой были растворены индивидуальные БАВ. Проводили 3 параллельных измерения. За результат измерения принимали среднее значение.

Результаты и обсуждение

2.1. Тотальный выход растительных экстрактов *M. officinalis*

Значения тотальных выходов экстрактов *M. officinalis* показаны в таблице 1.

Таблица 1

Тотальный выход экстрактов *M. officinalis*

Экстрагент	Выход экстракта, %
Метанол	14,49±0,43
Метанол + NaOH	16,19±0,51
Метанол + ТФУ	18,41±0,55

Анализ данных, представленных в таблице 1, показывает, что наиболее высокий тотальный выход наблюдался при экстракции метанолом в присутствии трифторуксусной кислоты.

2.2. Определение содержания вторичных метаболитов фенольной природы

Результаты ВЭЖХ анализа представлены в таблице 1. Анализ данных показывает, что щелочной экстракт содержал значительные количества 3,4-дигидроксibenзойной кислоты, в то время как в других экстрактах присутствовали лишь следовые количества этого компонента. Также цикориевая и п-кумаровая кислоты количественно определены только в экстракте с гидроксидом натрия. Можно сделать вывод, что щелочная среда экстрагента способствовала выделению этих БАВ. В нейтральном и кислом экстракте обнаружены гиперозид (или рутин) и кверцетин-3D-глюкозид. Кроме того, метанольный экстракт, полученный методом Сокслета, содержал лютеолин-7-глюкозид, астрагалин, акацетин и апигенин-7-О-глюкозид. В остальных экстрактах эти компоненты не были идентифицированы или присутствовали лишь в следовых количествах. Экстракт, полученный метанолом с ТФУ, в отличие от нейтрального и щелочного экстрактов, содержал кафтаровую кислоту.

Таблица 2

Содержание БАВ в экстрактах *M. Officinalis*

БАВ	Содержание БАВ в экстракте, мг/кг		
	метанол	метанол + NaOH	метанол + ТФУ
3,4-дигидроксibenзойная кислота	следы	35,99±1,08	следы
п-кумаровая кислота	-	22,68±0,68	-
гиперозид или рутин	15,26±0,45	-	58,19±1,75
кверцетин-3D-глюкозид	99,35±2,98	-	17,97±0,54
лютеолин-7-глюкозид	28,83±0,86	-	-
астрагалин	8,76±0,26	следы	-
розмариновая кислота	следы	-	следы
акацетин	2,28±0,07	-	-

БАВ	Содержание БАВ в экстракте, мг/кг		
	метанол	метанол + NaOH	метанол + ТФУ
апигенин-7-О-глюкозид	3,33±0,10	следы	следы
цикориевая кислота	следы	70,23±2,11	-
катехин	-	следы	-
кафтаровая кислота	-	-	22,07±0,66

2.3. Получение индивидуальных БАВ из экстрактов *M. officinalis*

В результате фракционирования удалось выделить в индивидуальном виде одно БАВ. Хроматограмма полученной фракции представлена на рисунке 1. Однако идентифицировать методом ВЭЖХ данное соединение не удалось. Установление структуры указанного БАВ будет проведено в дальнейшем с помощью ЯМР-спектроскопии. Выход этого соединения составил 100 мг/кг.

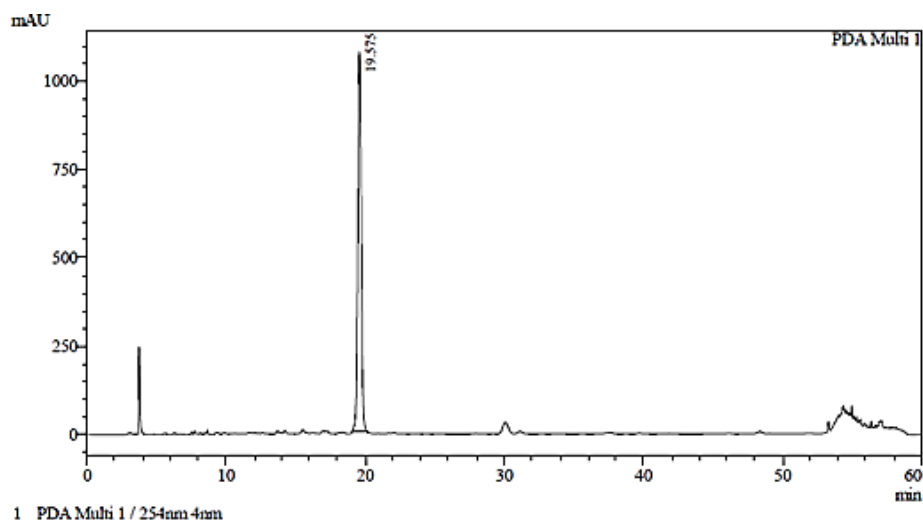


Рис. 1. Хроматограмма фракции из экстракта *M. officinalis*, полученного 0,1 н метанольным раствором ТФУ

2.4. Антиоксидантная активность БАВ

Полученный образец БАВ показал небольшие значения антиоксидантной активности. Результаты показаны в таблице 3.

Таблица 3

Антиоксидантная активность БАВ, выделенного из *M. officinalis*, ммоль экв. тролокса/г

ABTS	DPPH	FRAP
0,83 ± 0,04	0,028 ± 0,001	0,037 ± 0,001

2.5. Противомикробная активность БАВ

Полученное БАВ проявило активность в отношении *B. subtilis* в количестве 100 мкг на диске. Зона ингибирования при этом составила 7,5 мм (рисунок 2). При повышении концентрации БАВ до 150 мкг/диск наблюдалось увеличение зоны ингибирования до 8 мм. В отношении *E. coli*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* соединение не проявило противомикробной активности.

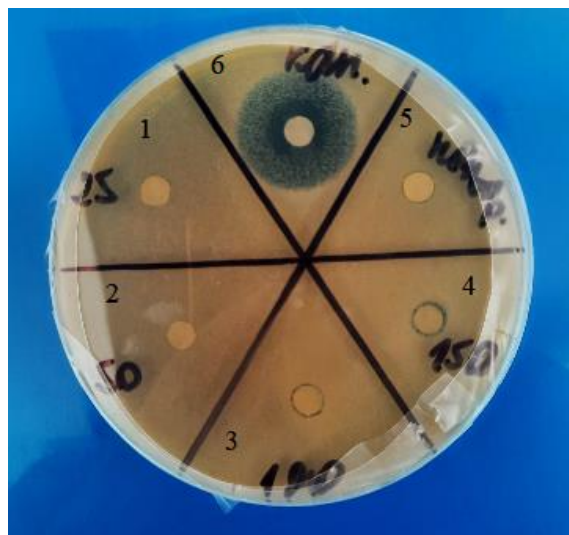


Рис. 2. Противомикробная активность производного катехина, полученного из донника лекарственного, в отношении *B. subtilis*
 1 – 25 мкг производного катехина; 2 – 50 мкг производного катехина; 3 – 100 мкг производного катехина; 4 – 150 мкг производного катехина; 5 – контроль (1 %-ная трифторуксусная кислота (31 %) и ацетонитрил (69 %)), 6 – канамицин 50 мкг

Вывод

В ходе данной работы получены различные экстракты *M. officinalis*, определены их тотальные выходы и содержание фенольных компонентов. Показано, что в зависимости от pH экстрагента содержание вторичных метаболитов фенольной природы отличается. Таким образом, варьируя кислотность среды, экстракцию можно проводить направленно.

Из кислого экстракта *M. officinalis* было получено индивидуальное БАВ, показывающее небольшие значения АОА, а также противомикробное действие в отношении *B. subtilis*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках исполнения Гранта Президента (соглашение No 075-15-2021-310 от 19.04.2021 г. (внутренний номер МД-135.2021.1.4)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Al-Snafi A. E. Chemical constituents and pharmacological effects of Melilotus Officinalis-A review // IOSR Journal of Pharmacy. – 2020. – Vol. 10. – №. 1. – P. 26-36
2. Pleşca-Manea L. et al. Effects of Melilotus officinalis on acute inflammation //Phytotherapy research. – 2002. – Vol. 16. – №. 4. – P. 316-319.
3. Po-Ki L. Studies on the Anti-tumor Activity of Coumarins & Their Action Mechanisms on Myeloid Leukemia Cells : – The Chinese University of Hong Kong, 2002.
4. Feduraev P. et al. Variability of Phenolic Compound Accumulation and Antioxidant Activity in Wild Plants of Some Rumex Species (Polygonaceae) // Antioxidants. – 2022. – Vol. 11. – P. 311.

OBTAINING INDIVIDUAL BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES AND PHYTOCHEMICAL COMPOSITION OF MELILOTUS OFFICINALIS EXTRACTS DEPENDING ON THE PH OF THE EXTRAGENT

¹Larina Viktoria Viktorovna, junior researcher, assistant

²Chupakhin Evgeniy Gennadievich, Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor

³Babich Olga Olegovna, D.Sc. (Technology), director of educational and research centre "Applied biotechnology"

⁴Bakhtiarova Alina Khalimovna, student

^{1,2,3,4}Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia,

e-mail: ¹surinac@mail.ru; ²chupakhinevgen@gmail.com; ³OOBabich@kantiana.ru;

⁴bakhtiarova.allina@yandex.ru

In the course of this work, Melilotus officinalis extracts were obtained by three types of extractants: methanol, methanol with trifluoroacetic acid (TFA) and methanol with sodium hydroxide. The greatest total yield of the extract was observed for acidic extract. Phenolic components such as 3,4-dihydroxybenzoic acid, p-cumaric acid, hyperoside or rutin, quercetin-3D glucoside, luteolin-7-glucoside, astragalgin, rosemarinic acid, acacetin, apigenine-7-O-glucoside were identified. An individual BAS was obtained from the acid extract. This substance showed antimicrobial action against Bacillus subtilis and low values of antioxidant activity (AOA).

УДК 663.674

МАРКЕТИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ИЗУЧЕНИЮ СПРОСА НА РЫБНЫЕ ФОРМОВАННЫЕ ИЗДЕЛИЯ

¹Лютова Екатерина Владимировна, канд. техн. наук

²Сутугин Михаил Александрович, студент

³Лесько Екатерина Сергеевна, студентка

^{1,2,3}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»,

Калининград, Россия, e-mail: ¹ekaterina.lyutova@klgtu.ru

Изучается спрос на новый продукт – формованные структурированные рыбные изделия. Предлагается разработать технологию и рецептуру полукопченых рыбных колбасок, которые будут отличаться повышенной биологической ценностью за счет введения в рецептурную фаршевую смесь икры и молок сельди атлантической.

В настоящее время как в нашей стране, так и за рубежом разработано множество технологий формованных изделий из гидробионтов: кулинарных изделий (котлеты, биточки, рыбные палочки), колбас, сосисок, консервов и др. Интерес к производству такой продукции обусловлен не только необходимостью расширения ассортимента, но и получением продуктов высокой пищевой и энергетической ценности: гидробионты богаты полноценными белками, липидами, содержащими в необходимом количестве предельные полиненасыщенные жирные кислоты, микро- и макроэлементами. Рыбные колбасные изделия часто употребляют в качестве диетических, лечебно-профилактических продуктов, а также в детском и школьном питании [1].

Целью настоящей работы является создание рыбных колбасок повышенной биологической ценности путём обогащения икрой и молоками сельди для потребления людьми всеми возрастными группам.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- Провести маркетинговые исследования и анализ потребительского рынка рыбных изделий в Калининградской области.
- Изучить и обосновать выбор основного сырья при производстве колбасок повышенной биологической ценности.
- Провести математическое моделирование рецептуры рыбных колбасок и обосновать соотношение вносимых икры и молок сельди в готовый продукт.
- Исследовать органолептические и физико-химические показатели, и обосновать функциональность рыбных варено-копченых колбасок.
- Разработать технологическую схему и нормативные документации на производство рыбных колбасок.

В качестве основного сырья при производстве рыбных колбасок выступает рыба мороженая (возможно использование также охлаждённой рыбы). Всё сырьё должно соответствовать нормативным документам, приведённым на слайде.

Икра и молоки сельди по всем показателям должны соответствовать требованиям существующей ТУ.

По показателям безопасности всё сырьё должно соответствовать ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» (Рыба – ТР ТС 040/2016 «Технический регламент о безопасности рыбы и рыбной продукции»).

Были проведены маркетинговые исследования потенциальных потребителей методом опроса путём самостоятельного заполнения анкет респондентами. Был применён структурированный опрос в ходе которого опрашиваемые отвечали на одинаковые вопросы.

С целью определения востребованности у потребителя варено-копченых колбасок из рыбы было проведено маркетинговое исследование, в ходе которого было опрошено 113 респондентов - жителей г. Калининграда и Калининградской области, с помощью применения специальной шкалы.

Опрос был проведен в режиме онлайн анкетирования по ссылке https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdUt4GJxIJdn_nhZHfPnm31eJrRn6JgeS3ym1sroyrrNrWQ/closedform в социальной сети «ВКонтакте».

В исследовании участвовали люди разных половых и возрастных категорий. 55,4 % опрашиваемых были женщины и 44,6 % - мужчины, в возрасте от <18 до >45 лет.

В ходе проведенных исследований была установлена периодичность употребления рыбы среди прошедших опрос: 68% опрошенных употребляют рыбу или рыбные продукты 1 раз в неделю или чаще, 17% 2 раза в месяц, 5% реже двух раз в месяц и 10% вовсе не употребляют рыбу или рыбные продукты (Рис. 1).

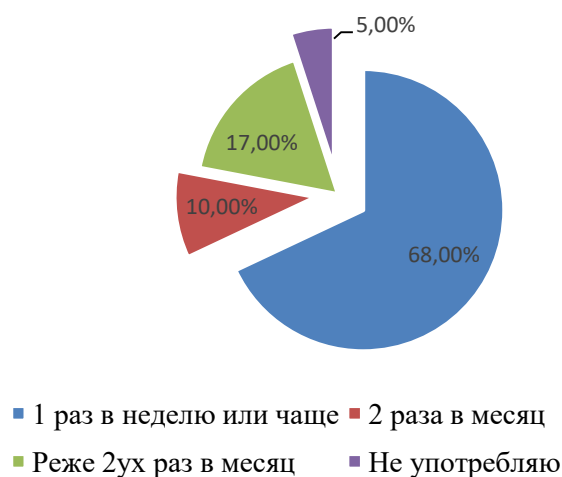


Рис. 1. Периодичность употребления рыбы и рыбных продуктов среди населения Калининградской области

Большая часть респондентов (51 %) является неудовлетворенной качеством рыбной продукции, представленной на рынке Калининградской области (Рис..2)

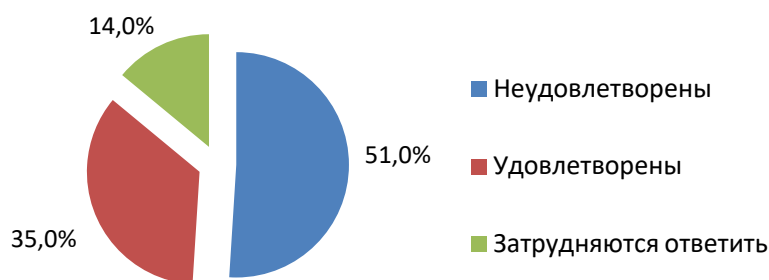


Рис. 2. Удовлетворенность потребителя качеством рыбной продукции в Калининградской области

Была установлена заинтересованность потенциального потребителя в появлении на рынке большего числа структурированных рыбных изделий, к которым относится разрабатываемый продукт, по итогу была выявлена тенденция, что большая часть опрошиваемых (57%) обладает интересом к структурированным рыбным изделиям (Рис. 3).

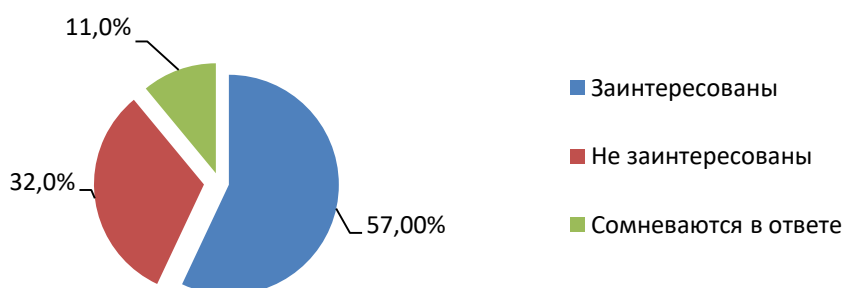


Рис. 3. Заинтересованность в структурированных рыбных изделиях

Участникам исследований был задан вопрос касательно желая попробовать колбаски из рыбы, обогащенные икрой и молоками сельди. Количество проголосовавших за положительный вариант ответа составило 79% (Рис. 4).

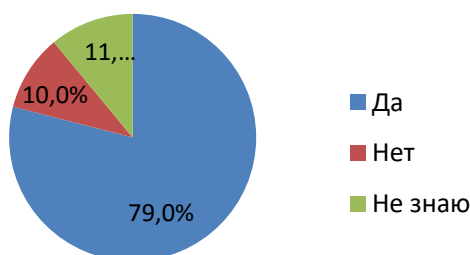


Рис. 4. Готовность респондентов к употреблению рыбных колбасок, обогащенных гонадами сельди

Исходя из полученных результатов маркетингового исследования, можно сделать вывод о том, что население Калининградской области заинтересовано в появлении на рынке рыбных колбасок, обогащенных гонадами сельди, в связи с этим можно сделать вывод, что цех по производству рыбных колбасок в Калининградской области будет востребован и рентабелен.

В ходе опроса также была исследована следующая информация:

1. Половая принадлежность: женский – 55,4%; мужской – 44,6%.
2. Возрастные категории: до 18 лет (14,3%); 18-25 лет (52,1%); 26-35 лет (22%); 36-45 лет (8,2%); старше 45 лет (3,4%).

3. Периодичность употребления рыбы или рыбных изделий : один раз в неделю или чаще (68%); два раза в месяц (17%); реже двух раз в месяц (5%); не употребляю (10%).

4. Удовлетворенность потребителя качеством рыбной продукции в Калининградской области: Удовлетворен (35%); неудовлетворен (51%); затрудняюсь в ответе (14%).

5. Заинтересованность потребителя в появлении на рынке структурированных рыбных изделий: Заинтересован (57%); не заинтересован (32%); сомневаюсь в ответе (11%).

6. Желание покупки рыбных колбасок, обогащенных гонадами сельди: Да (79%);нет (10%); не знаю(11%)

По результатам проведенных маркетинговых исследований можно сделать вывод о том, что большинство опрошенных высоко заинтересованы в употреблении предлагаемого им структурированного рыбного изделия, обогащенного гонадами сельди, что свидетельствует о целесообразности разработки технологии данного продукта.

В результате проведенных экспериментов была получена серия образцов варено-копченых рыбных колбасок из различных видов рыб, представленных на рынке города Калининграда, анализ органолептической оценки которых приведен в таблице 1.

Дегустаторами были отмечены высокие органолептические качества колбасок на основе фарша, полученного из судака и горбуши (соотношение частей фарша соответственно 5 к 3), в особенности, дегустаторы оценили аппетитный цвет готового продукта, и на основании этого для дальнейшей работы был выбран фарш на основе судака и горбуши.

Также, дегустаторами была отмечена уникальность продукции, представленной им, из-за скудности рынка структурированных рыбных изделий.

Таблица 1

Органолептическая оценка качества рыбных колбасок, приготовленных на основе фарша из различных видов рыб. (Пропорции относительно других компонентов идентичны)

Растительные компоненты в рецептуре	Балльная оценка органолептических характеристик продукции					Средний балл
	Внешний вид	Вкус	Запах	Цвет	Консистенция	
Судак +горбуша	5	4,9	5	4,9	5	4,96
Лещ +горбуша	4	4,8	3	4	5	4,16
Окунь морской +горбуша	5	4,8	4	4	5	4,56
Судак	4,9	4,8	5	3	5	4,54

Выбранное сырьё показало лучшие показатели, среди прочих вариантов по совокупности баллов, что и послужило выбором фарша на основе судака и горбуши, в качестве основного сырья для последующих исследований.

Икра и молоки сельди являются ценным пищевым сырьём. В зависимости от вида рыбы они содержат от 14 до 31% белка с полным набором незаменимых и заменимых аминокислот, от 0,3 до 15% жира, 1,5 – 2,0% минеральных веществ [2].

Икра и молоки богаты полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), жирорастворимыми витаминами А, Д, Е, F и К, а также биологически активными веществами (БАВ), необходимыми для нормального обмена веществ. В икре и молоках рыб всегда содержится больше белка и жира, чем в мышечной ткани [2]. Было принято решение использовать икру и молоки сельди атлантической в рецептуре разрабатываемых колбасок для повышения их биологической ценности.

Химический состав икры и молок сельди представлен в таблице 2.

Таблица 2

Общий химический состав икры и молок сельди атлантической

Гонады сельди	Массовая доля, %				Энергетическая ценность, ккал/100 г
	воды	белка	жира	минеральных веществ	
Икра	65,00 ± 0,1	21,70 ± 0,1	9,40 ± 0,2	3,90 ± 0,1	171,4
Молоки	74,00 ± 0,1	16,22 ± 0,1	4,60 ± 0,15	5,18 ± 0,1	106,3

Исходя из общего химического состава можно заметить, что гонады сельди являются высокобелковым продуктом.

Благодаря полученным результатам, удалось составить рецептуру обогащенных рыбных колбасок (таблица 3), торговое наименование которым дали «Рыбное чудо».

Таблица 3

Рецептура обогащенных рыбных колбасок кг на 100 кг продукта

Наименование ингредиента	Расход сырья на 100 кг готовой продукции
Филе судака, кг	50
Филе горбуши, кг	30
Молоки сельди, кг	5
Икра сельди, кг	3
Масло растительное, л	3
Сухое молоко, кг	2
Соевый изолят, кг	1,5
Соль поваренная, кг	0,9
Нитрит натрия, %	0,005
Пищевая добавка «Мускат», кг	5,5

Был проведён анализ качества колбасок, по органолептическим и физико-химическим показателям качества. Разрабатываемый продукт представлен на рисунке 1.



Рис. 1. Внешний вид рыбных колбасок

В настоящее время продолжают дальнейшие исследования качества, энергетической и биологической ценности и химического состава колбасок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верболоз Елена Игоревна, Распопов Дмитрий Сергеевич, Шестакова Екатерина Александровна Технология повышения стойкости рыбной продукции с добавлением белково-жировой эмульсии, обработанной ультразвуком и магнитным полем, к окислительным процессам при хранении // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. 2019. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/tehnologiya-povysheniya-stoykosti-rybnoy-produktsii-s-dobavleniem-belkovo-zirovoy-emulsii-obrabotannoy-ultrazvukom-i-magnitnym-polem-k> (дата обращения: 14.09.2022).

2. Дементьева Наталья Валерьевна, Богданов Валерий Дмитриевич Исследование технологических показателей икры сельди тихоокеанской // Вестник МГТУ. 2017. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-tehnologicheskikh-pokazateley-ikry-seldi-tihookeanskoy> (дата обращения: 14.09.2022).

MARKETING RESEARCH TO STUDY THE DEMAND FOR FISH MOLDED PRODUCTS

¹Liutova Ekaterina Vladimirovna, PhD, Associate Professor

²Sutugin Mikhail Alexandrovich, student

³Lesko Ekaterina Sergeevna, student

^{1,2,3}FSBEI HE "Kaliningrad state technical university",
Kaliningrad, Russia, e-mail: ¹ekaterina.lyutova@klgtu.ru

The article is devoted to the study of demand for a new product being developed - molded structured fish products. It is proposed to develop a technology and recipe for semi-smoked fish sausages. The developed fish sausages will be of high biological value due to the addition of Atlantic herring caviar and milk to the minced mixture.

УДК 664.66.022.39

ОБОГАЩЕННЫЕ ХЛЕБОБУЛОЧНЫЕ ИЗДЕЛИЯ С ДОБАВЛЕНИЕМ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ НЕРЫБНЫХ ОБЪЕКТОВ ВОДНОГО ПРОМЫСЛА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ

¹Лях Владимир Алексеевич, канд. техн. наук, доцент факультета агропищевых биотехнологий и пищевой инженерии

²Хасиева Айна Дурахмедовна, аспирант факультета агропищевых биотехнологий и пищевой инженерии

³Шаманская Анастасия Александровна, аспирант факультета агропищевых биотехнологий и пищевой инженерии

^{1,2,3}ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», ПИШ «Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем», Владивосток, Россия, e-mail: ¹lyah.va@dvfu.ru

*Приведены результаты разработки пшеничного хлеба с использованием нового ингредиента – гидротермического экстракта гребешка приморского *Mizuhopecten yessoensis*, содержащего в своём составе биологически активные и минеральные вещества и микроэлементы, обладающие доказанным положительным действием на организм человека. Подобраны рациональные дозировки экстракта, исключающие технологические риски его использования в рецептуре хлебобулочных изделий. Определено остаточное содержание йода, обеспечивающее профилактический эффект от употребления хлеба.*

Одним из перспективных направлений, согласно стратегии развития агропромышленного и рыбохозяйственного комплексов РФ на период до 2030 года, являются базовые пищевые биотехнологии, в том числе для производства специализированной пищевой продукции (Распоряжение Правительства РФ от 08.09.2022 №2567-р), что также находит отражение в других правительственных документах в области проблематики обогащения пищевой продукции различными макро- и микро-нутриентами, устойчивого социально-экономического развития, повышения продовольственной безопасности РФ, развития научно-технологического потенциала и т.д.

Пищевая продукция, которая относится к массовому потреблению (напитки, мясные изделия, молочная продукция, хлеб и хлебобулочные изделия, и др.), относится к приоритетной в области разработки новых видов продуктов питания. Наверное, главными продуктами в указанном списке

являются хлебобулочные изделия (хлеб в первую очередь), так как они являются базовыми продуктами в рационе питания населения – продукты первой необходимости, а хлебопекарная отрасль является одной из ведущих в агропромышленном комплексе РФ.

Учитывая сырьевую составляющую, производственные факторы, условия рынка, многие ученые, занимающиеся проблемами хлебопечения отмечают, что пищевая ценность хлеба удовлетворяет не всем требованиям нутрициологии, поэтому по сей день остается актуальным вопрос по созданию обогащенных хлебобулочных изделий для диетического профилактического питания.

Не используя новые ингредиенты, новые виды сырья, содержащего в своем составе биологически активные субстанции, невозможно спроектировать новый ассортимент хлебобулочных изделий, отвечающий требованиям нутрициологии. В качестве новых ингредиентов чаще всего применяют растительное и животное сырье в нативном виде, БАД на их основе, минеральные композиции, пищевые добавки, обладающие, помимо технологических свойств, еще и биологической активностью [1, 2].

Видовое многообразие морских биологических ресурсов – это неограниченный ресурс в области создания новых ингредиентов для функционального и специализированного питания, пищевых добавок, БАД к пище и др. По многочисленным данным российских и зарубежных исследователей, нерыбные объекты водного промысла животного происхождения, и не только, содержат редкие соединения, которых нет в составе наземных организмов, что вызвано условиями их существования в водной среде.

Морские биологические ресурсы характеризуются не только многообразием форм, видов и значительной эффективностью входящих в их структуру веществ и соединений, которые не имеют негативного воздействия на организм человека, но и имеют воспроизводимую сырьевую базу, что может оказаться важным при необходимости получения каких-либо определенных химических веществ из них в промышленном масштабе [3,4].

Термостабильность в технологическом процессе производства пищевых продуктов и явная биологическая активность соединений из морских биологических ресурсов, позволяет вносить их в базовые рецептуры в мизерных долях без появления возможных технологических рисков – без изменения физико-химических и органолептических показателей качества [5].

Аналогичные взгляды разделяют зарубежные ученые, описывающие в своих работах о соединениях из морских биологических ресурсов, которые широко используются в пищевых системах, в частности в изделиях из муки (хлеб, хлебобулочные изделия, макаронные изделия), так как они являются наиболее употребляемыми и самими подходящими для внесения новых ингредиентов [6].

Нерыбные объекты водного промысла животного происхождения (промысловые моллюски, иглокожие, ракообразные, морские млекопитающие и др.), их структурные компоненты, побочные продукты их переработки имеют большой потенциал для расширения ассортимента хлеба, обладающего повышенной пищевой и биологической ценностью, а также позволяет отнести такие изделия к группе хлебобулочных изделий с профилактической направленностью [7].

Морской гребешок как диетический продукт с высоким содержанием белка является очень ценным двустворчатый моллюском. его мясо – это источник незаменимых аминокислот, минеральных веществ, биологически активных веществ, водорастворимых витаминов и др. Кроме того, БАВ из морского гребешка способствуют повышению иммунитета и улучшению обмена веществ в организме человека [8]. Дальневосточный гребешок, имеет высокие потребительские характеристики, не имеет аналогов, по химическому составу и набору биологически активных веществ гребешок имеет наиболее высокие конкурентные преимущества в пищевых технологиях, поэтому он активно культивируется, что позволяет его абсолютно легально извлекать из природной среды для хозяйственных целей, восстанавливать его популяцию [6].

С точки зрения биологической и пищевой ценности, морской гребешок способствует обогащению продуктов питания массового потребления, но использование в рецептуре таких дорогостоящих продуктов приведет к увеличению себестоимости и розничной цены, что весьма негативно может сказаться на потребителях в финансовом плане [8, 9]. Но если на предприятии не комплексно и не рационально использовать такое дорогостоящее сырье, то это будет способствовать появлению экономических потерь и снижению рентабельности производства.

Потере уникальных веществ с выраженными функциональными свойствами способствует

использование в большинстве технологий по производству и переработке дорогостоящей продукции из гидробιονтов термической обработки (варка, бланширование). Но при применении в технологии производства других продуктов варочных и бланшировочных вод (т.н. гидротермических экстрактов) позволит существенно расширить ассортимент пищевых продуктов массового потребления, а также поспособствует приданию им профилактической направленности [10].

Исходя из вышеизложенного, было выбрано направление нашей работы по созданию хлеба из пшеничной муки с профилактическими свойствами за счет введения в его рецептуру гидротермического экстракта (варочных вод) из нерыбных объектов водного промысла на примере гребешка приморского (*Mizuhopecten yessoensis*).

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы явилась разработка хлеба из пшеничной муки высшего сорта, обогащенного продуктами переработки нерыбных объектов водного промысла животного происхождения - гидротермическим экстрактом гребешка приморского *Mizuhopecten yessoensis*, для профилактического питания.

Объектом исследования в данном фрагменте работы явился хлеб из пшеничной муки высшего сорта с добавлением гидротермического экстракта гребешка приморского *Mizuhopecten yessoensis*, разработанный по собственному стандарту организации и защищенного патентом РФ № 2703199 «Состав для производства хлебобулочных изделий».

Исследования сырьевых компонентов на соответствие требованиям стандартов и опытных образцов хлеба проводили в лабораториях Передовой инженерной школы «Институт биотехнологии, биоинженерии и пищевых систем» (ранее Институт наук о жизни и биомедицины (Школа) и Школы экономики и менеджмента), Испытательного центра «Океан» ДВФУ. Было изучено влияние экстракта гребешка приморского на хлебопекарные свойства пшеничной муки (показатели качества и количества сырой клейковины), а также на органолептические и физико-химические показатели качества готовых хлебобулочных изделий по методикам, описанным в ГОСТ. Исследовали экстракт и хлеб с его добавлением по показателям безопасности в соответствии с требованиями НД РФ и ЕАЭС – сам экстракт гребешка приморского и хлеб с его добавлением полностью соответствовали требованиям по показателям безопасности [11, 12].

Ключевой задачей при использовании в технологическом процессе нового ингредиента является оценка технологических рисков. Для этого в лабораторно-производственных условиях на базе ДВФУ проводили выпечку образцов подового хлеба из пшеничной муки высшего сорта с частичной заменой воды на гидротермический экстракт гребешка приморского в различных массовых долях - 25-100 %. В качестве контрольного образца был взят образец хлеба без добавления экстракта гребешка приморского, который также готовили в лабораторных условиях.

Влияние экстракта гребешка приморского на хлебопекарные свойства пшеничной муки оценивали по результатам анализа количества и качества сырой клейковины, проводимого по общепринятой методике с использованием измерителя деформации клейковины. Полученные данные по массовой доле количества сырой пшеничной клейковины и ее качества в зависимости от массовой доли вносимого экстракта гребешка приморского показали следующее: при замене воды на гидротермический экстракт гребешка приморского отмечали изменение группы качества пшеничной клейковины. Образец без экстракта гребешка приморского, как и с заменой экстракта в массовой доле 25 % относятся ко 2 группе качества, а образцы с заменой экстракта в массовых долях 50, 75 и 100 % относятся к 1 группе качества. Отмечали тенденцию к усилению пшеничной клейковины, о чем свидетельствуют показания прибора ИДК. Была отмечена разнонаправленная тенденция, которая не показывает прямой зависимости от массовой доли вносимого экстракта гребешка приморского.

Повышение массовой доли сырой пшеничной клейковины отмечали при замене воды гидротермическим экстрактом гребешка приморского в массовых долях 25, 75 и 100 %, что объясняется повышением содержания ее основных белков, что в последствии ведет к увеличению показателя удельного объема готовых изделий.

Возможность воздействия экстракта гребешка приморского на процессы брожения при технологическом процессе производства хлеба определяли по показателю подъемной силы хлебопекарных дрожжей и по накоплению численного количества дрожжевых клеток в тестовом полуфабрикате. Гидротермический экстракт гребешка приморского вносили в определенном процентном соотношении от объема водного раствора поваренной соли.

На рисунке 1 представлена диаграмма, которая свидетельствует о том, что добавление гидротермического экстракта гребешка приморского в массовых долях 25, 50, 75 и 100 % оказывает положительное влияние на время подъема тестовой заготовки.

Анализируя требования нормативной документации, установлено, что показатель подъемной силы сила хлебопекарных дрожжей всех опытных образцов соответствует требованиям ГОСТ. Экстракт гребешка приморского оказал положительное влияние на жизнедеятельность хлебопекарных дрожжей, являясь вспомогательным компонентом, стимулирующим их развитие за счет наличия в составе гидротермического экстракта свободных аминокислот, минеральных веществ, экстрактивных веществ и др.

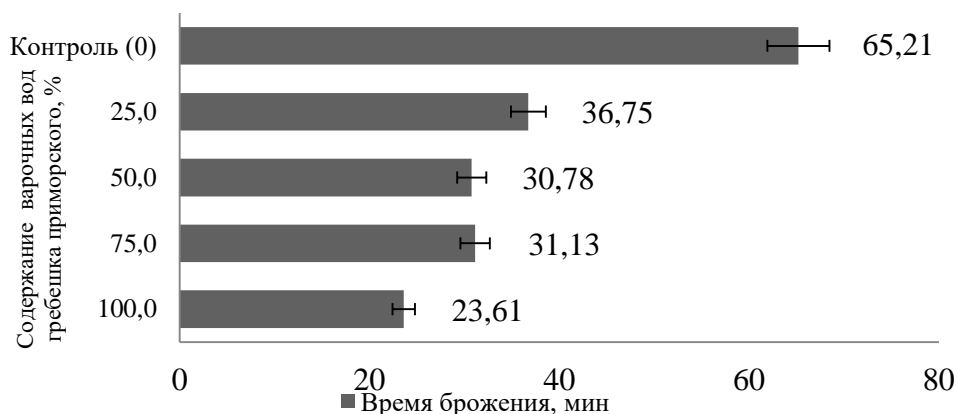


Рис. 1. Влияние гидротермического экстракта гребешка приморского в различных массовых долях на время брожения (подъемную силу) хлебопекарных дрожжей

Обработав результаты дегустационного анализа, можно сделать заключение о том, что образцы с массовыми долями экстракта гребешка приморского 75 и 100 % по результатам органолептической оценки показали наилучшие результаты в сравнении с контрольным образцом и образцами с более низким содержанием экстракта гребешка приморского. В заданных массовых долях гидротермический экстракт гребешка приморского не только не ухудшает потребительские характеристики образцов хлеба, но по таким органолептическим показателям как цвет хлебного мякиша, его эластичность, вкус и аромат способствует их повышению, что показывает отсутствие технологических рисков у выбранных массовых долей гидротермического экстракта гребешка приморского.

В качестве показателя, который обеспечивает профилактические свойства разрабатываемого хлеба, было определено содержание йода, которым богат экстракт гребешка приморского. Важным показателем в технологии хлеба является определение содержания йода и его сохранность в продукте – остаточное содержание. Как известно, недостаток йода приводит к возникновению различных йод дефицитных заболеваний, а избыток – к гиперфункции щитовидной железы. В научных изданиях имеются разнообразные сведения, связанные с разрушением йода при термической обработке продуктов питания и полуфабрикатов. Есть данные, которые свидетельствуют о потере до 46 % йода при выпечке хлеба, но также некоторые ученые в своих работах отмечают об отсутствии потерь йода в процессе выпечки хлеба и хлебобулочных изделий [13]. Такие разные сведения, скорее всего связаны с разными формами вносимого йода - элементарный или органически связанный.

Утвержденные нормы физиологической потребности [14] устанавливают физиологическую потребность для взрослого человека в йоде в количестве 0,150 мг/сут. Для определения рекомендуемой порции хлеба в сутки были использованы рекомендации по рациональным нормам потребления пищевых продуктов [15], согласно которым рекомендуемый объем потребления хлебобулочных изделий в год на человека составляет 95-105 кг. В пересчете на суточную потребность получили - 200-250 г/сут.

С целью выявления остаточного содержания йода были проведены исследования образцов хлеба с добавлением (заменой воды) гидротермического экстракта гребешка приморского *Mizuhopecten yessoensis* в массовой доле 100 % от массы воды (в ходе проведенных исследований определена как рациональная). На рисунке 2 представлены полученные вольтамперограммы образцов хлеба с добавлением гидротермического экстракта гребешка приморского.

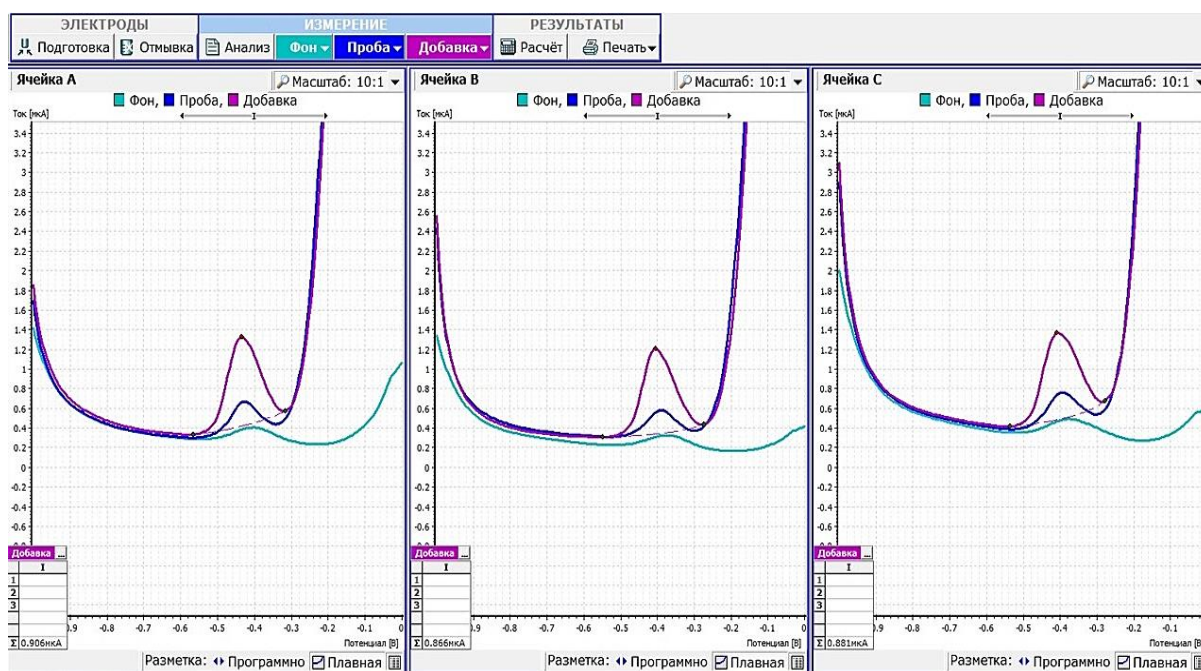


Рис. 2. Вольтамперограмма при определении содержания йода в составе образца хлеба с добавлением гидротермического экстракта гребешка приморского

Проведенные исследования по определению остаточного содержания йода и проведенных расчетов можно сделать вывод о том, что хлеб пшеничный с добавлением экстракта гребешка приморского в массовой доле 100 % по утвержденным физиологическим нормам способствует удовлетворению суточной потребности в йоде на 108 %, т.к. содержание йода составляет 0,162 мг.

Таким образом, на основании проведенных исследований показана возможность использования гидротермического экстракта гребешка приморского *Mizuhopecten yessoensis* в качестве нового обогащающего ингредиента в пищевых системах на примере хлеба из пшеничной муки высшего сорта. В ходе исследований отмечено положительное влияние гидротермического экстракта гребешка приморского на биотехнологические свойства хлебопекарных дрожжей, а также на потребительские характеристики разработанного хлеба. Установлена рациональная массовая доля гидротермического экстракта гребешка приморского *Mizuhopecten yessoensis*, при которой хлеб максимально сохраняет потребительские характеристики и соответствует нормам по показателям качества – 100 %.

Кроме того, разработанный хлеб из пшеничной муки высшего сорта с добавлением гидротермического экстракта гребешка приморского является продуктом для диетического профилактического питания по содержанию такого микроэлемента как йод. Определено, что в разработанном хлебе с экстрактом содержание йода составляет 0,162 мг/кг, а потребность в йоде у взрослого человека составляет 0,15 мг/сут. Таким образом, при суточной норме употребления хлеба в 200 г удовлетворяется потребность в йоде на 108 %.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных. Номер гранта МК-3686.2021.4. Тема научного исследования «Рациональное использование продуктов переработки нерыбных объектов водного промысла в технологии безопасных и качественных продуктов питания» (Соглашение №075-15-2021-340).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Матвеева, Т.В. Физиологически функциональные пищевые ингредиенты для хлебобулочных и кондитерских изделий: монография / Т.В. Матвеева, С.Я. Корячкина. – Орел: ФГБОУ ВПО «Госуниверситет – УНПК», 2012. – 947 с.
2. Косован, А.П. Время кардинально решать проблему качества хлеба / А.П. Косован, Н.Т. Чубенко // Хлебопечение России. – 2015. – № 5. – С. 4-5.

3. Newman, D.J. The influence of natural products upon drug discovery / D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader // Natural product reports. – 2000. – N 17(3). – P. 215-234.
4. Лях, В.А. Перспективные биологически активные добавки морского происхождения для производства хлебобулочных изделий функциональной направленности / В.А. Лях, Л.Н. Федянина, Е.С. Смертина // Технические год науки - от теории к практике, 2012. – № 12. – С. 76-80.
5. Proksch, P. Drugs from the seas - current status and microbiological implications / P. Proksch, R.A. Edrada, R. Ebel // Applied microbiology and biotechnology. 2002. – N 59(2-3):– P.125-134.
6. Kadam, S.U. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products / S.U. Kadam, P. Prabhasankar // Food Research International. – 2010. – N 43 (8). – P. 1975–1980.
7. Мезенова, О.Я. Биотехнология их рационального её использования гидробионтов: учебник / дал под ред. О. Я. Мезеновой. – Санкт–Петербург: Лань, 2013. – 412 с.
8. Лях, В.А. Современные тенденции применения гидробионтов животного происхождения в качестве функциональных ингредиентов для хлебобулочных изделий / В.А. Лях, Л.Н. Федянина, М.М. Донец, Е.С. Смертина // Хлебопродукты. – 2019. – № 5. – С.48-53.
9. Скрынникова, И. А. Исследование современных трендов в хлебопекарной промышленности / И. А. Скрынникова // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2017. – Т. 24. – С. 109–115.
10. Косован, А.П. Наука о хлебе в поиске оптимальных решений отраслевых проблем / А.П. Косован // Хлебопечение России, 2012. – № 1. – С. 4-6.
11. ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции [Текст]. – Введ.: 2013-07-01. – Электросталь: ЦНТД «Регламент», 2012. – 164 с.
12. ГОСТ 27669-88 Мука пшеничная хлебопекарная. Метод пробной лабораторной выпечки хлеба. – М.: Стандартинформ, 2007. – 10 год с.
13. Цуканова, Л.Н. Совершенствование технологии обогащенных хлебобулочных изделий на основе моделирования рецептурных смесей / дис. ... канд. техн. так наук.: 05.13.01 / Людмила Николаевна Цуканова. – Москва: 2010. – 188 с.
14. МР 2.3.1.2432-08 Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. - Введ.: 2008-12-18. – Минздрав РФ.
15. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 02.08.2010 N 593н «Об утверждении рекомендаций по рациональным нормам потребления пищевых продуктов, отвечающим современным требованиям здорового питания» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 11.10.2010 N 18680).

ENRICHED BAKERY PRODUCTS WITH ADDITION OF PROCESSING PRODUCTS OF NON-FISH OBJECTS OF WATER INDUSTRY FOR PREVENTIVE NUTRITION

¹Lyakh Vladimir Alekseevich, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Faculty of Agro-Food Biotechnologies and Food Engineering

²Khasieva Aina Durakhmedovna, PhD student, Faculty of Agro-Food Biotechnologies and Food Engineering

³Shamanskaya Anastasia Aleksandrovna, PhD student of the Faculty of Agro-Food Biotechnologies and Food Engineering

^{1,2,3}Far Eastern Federal University, Advanced Engineering School "Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems", Vladivostok, Russia, e-mail: ¹lyah.va@dvfu.ru

*The article presents the results of the development of wheat bread using a new ingredient - a hydrothermal extract of the seaside scallop *Mizuhopecten yessoensis*, which contains biologically active substances, minerals, microelements and has a proven positive effect on the human body. Rational dosages of the extract were selected, excluding the technological risks of its use in the recipe of bakery products. The residual iodine content was determined, which provides a preventive effect from eating bread.*

ПРИМЕНЕНИЕ ХИТОЗАНА ПРИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКЕ ОТХОДОВ ИКОРНОГО ПРОИЗВОДСТВА

¹Максимова Светлана Николаевна, д-р техн. наук, профессор,
зав. кафедрой «Технология продуктов питания»

²Полещук Денис Владимирович, канд. техн. наук, доцент,
доцент кафедры «Технология продуктов питания»

³Подленный Лев Юрьевич, аспирант кафедры «Технология продуктов питания»

^{1,2,3}ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз», Владивосток, Россия, e-mail: ¹maxsvet61@mail.ru

Представлена информация о высоком технологическом потенциале отходов, образующихся при пробивке ястыков лососевых рыб. Рассмотрены перспективы применения биополимера хитозана для предотвращения окисления исследуемого вторичного сырья при производстве из него биологически ценной продукции.

Введение

Лососевая икра представляет собой ценный в пищевом отношении продукт, обладающий высокими вкусовыми качествами и пользующийся большим спросом у населения. Традиционным широко распространенным среди рыбоперерабатывающих предприятий Дальнего Востока способом консервирования икры лососевых рыб является посол. Технология соленой икры включает ряд операций, одной из которых являются отделение зерна из ястыков (пробивка). В результате выполнения этой операции на предприятиях скапливается значительное количество неиспользуемых отходов, технологический потенциал которых позволяет использовать их как вторичное сырье для получения биологически ценной продукции. [1,2].

Как показали результаты проведенных экспериментальных исследований, отходы икорного производства содержат от 3 до 6 % липидов (в зависимости от содержания воды).

Содержание липидов в отходах от пробивки лососевых с одной стороны увеличивает их пищевую ценность, с другой стороны существенно усложняет технологический процесс их сбора и переработки, в том числе и вследствие происходящих окислительных процессов.

Данная проблема может быть решена путем внесения в сырье или полуфабрикат антиоксиданта, предотвращающего гидролиз и последующее окисление липидов. Поскольку конечной целью технологической обработки отходов икорного производства является получение биологически ценной продукции, использование химических соединений является нежелательным.

Практическое использование биополимера хитозана в качестве полезного природного антиоксиданта позволило предположить перспективное применение его при переработке исследуемого вторичного сырья [4]. Химическая структура и способность цепи хитозана к деструкции под действием гидроксильных радикалов и взаимодействию с активными формами кислорода позволяют ему выполнять функции антиоксиданта. Известны различные механизмы антиоксидантного действия хитозана: восстановление радикалов, хелатирование металлов, блокирование реакционноспособных групп жирных кислот. Последний из перечисленных механизмов, является базисным в экспериментах по связыванию молекул жира в опытных образцах. Положительно заряженные молекулы хитозана могут связываться с отрицательно заряженными группами жирных кислот. Одна молекула хитозана способна связать в 4-8 раз больше себя молекул жира [5,6].

Цель данных научных исследований - поиск способа обезжиривания отходов икорного производства и снижение их способности к окислению при хранении и последующем использовании для получения биологически ценной продукции.

Материалы и методы исследования

Основным материалом в научной работе послужили отходы от икорного производства, остающиеся на рыбоперерабатывающем предприятии при пробивке ястыков лососевых, собранные в августе 2021 года.

В качестве антиокислителя в данной работе применяли хитозан водорастворимый с молекулярной массой 55 кДа. Поскольку известно, что хитозан, будучи катионом, способен вступать в полиэлектролитное взаимодействие с полианионами и при этом в составе полиэлектролитного комплекса (ПЭК) усиливать свои функциональные свойства, то в работе использовали не только хитозан, но и его ПЭК с альгинатом натрия.

При выполнении научно-исследовательской работы использовали следующие перечисленные ниже методы исследования.

Отбор проб сырья и подготовку проб к анализу проводили по стандартным методикам (ГОСТ 31339-2006, ГОСТ 7631-2008).

Массовую долю липидов определяли по методу Блайя и Дайэра [68].

Жирные кислоты определяли в виде их метиловых эфиров на капиллярном газо-жидкостном хроматографе «Shimadzu GC-16A» (Supelcowax-10) с пламенно-ионизационным детектором, снабженным капиллярной колонкой (30,0 м ´ 0,3 мм), при температуре 190 °С. Идентификация сигналов проводилась по относительному времени удержания, углеродным числам в соответствии со стандартной смесью жирных кислот и базой обработки данных «С-R4A» [69].

Определение кислотного числа проводили согласно следующей методике. Пробу в количестве 2-10 г отвешивали в коническую колбу ёмкостью 250-350 мл и растворяли в смеси, состоящей из 2 частей серного эфира и 1 части этилового спирта, взятой в количестве 30-50 мл. К спиртово-эфирному раствору жира добавляли 1 мл фенолфталеина и титровали 0,1N раствором едкого калия при постоянном взбалтывании до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 2 минут. Для расчета кислотного числа использовали формулу (1):

$$X = \frac{5,61 \times a}{b}, (1)$$

где а- количество 0,1 N щелочного раствора, которое ушло на титрование,

b – навеска жира в г,

5,61 – количество едкого калия, соответствующее 0,1N раствору щелочи в мг.

Результаты и их обсуждение

Известно, что биологическая эффективность липидов определяется как количественное соотношение в них наиболее ценных для организма незаменимых и высоконепредельных жирных кислот (таблица 1).

Таблица 1

Состав жирных кислот в липидах отходов от пробивки ястыков лососевых, %

Жирная кислота	Пленки от ястыков икры
Лауриновая 12:0	0,17
Миристиновая 14:0	3,40
Изо-пентадекановая i-15:0	0,10
Пентадекановая 15:0	0,41
Пальмитиновая 16:0	12,28
Изо-маргаринаовая i-17:0	0,21
ai-17:0	0,12
Маргаринаовая 17:0	0,33
Изо-стеариновая i-18:0	0,22
Стеариновая 18:0	4,11
Арахидиновая (Экозановая) 20:0	0,17
Насыщенные	21,52
Цис-7-Гексадекановая 16:1 ω 7	5,86
Цис-5-Гексадекановая 16:1 ω 5	0,26

Жирная кислота	Пленки от ястыков икры
Олеиновая 18:1 ω 9	19,41
Вакценовая 18:1 ω 7	3,09
Цис-5-Октадекаеновая 18:1 ω 5	0,79
19:1 ω 9	0,20
Гадоленовая 20:1 ω 11	0,35
Гондоеивая 20:1 ω 9	1,04
Цис-7-Эйкозаеновая 20:1 ω 7	0,33
Цис-11-Докозеновая (Цетолеивая) 22:1 ω 11	0,51
Цис-9-Докозеновая 22:1 ω 9	0,26
Мононенасыщенные	32,10
Цис-4-Гексадекадиеновая 16:2 ω 4	1,12
Гексадекатриеновая 16:3 ω 3	0,54
Цис-9-Октадекадиеновая 18:2 ω 9	0,16
Линолевая 18:2 ω 6	1,35
Цис-4-Октадекадиеновая 18:2 ω 4	0,17
γ-Линоленовая 18:3 ω 6	0,21
α-Линоленовая 18:3 ω 3	0,71
Стиридовая 18:4 ω 3	0,55
18:4 ω 1	0,20
19:4 ω 3	0,22
Арахидоновая 20:4 ω 6	1,25
Цис-3-Эйкозатриеновая 20:3 ω 3	0,12
Цис-3-Эйкозатетраеновая 20:4 ω 3	1,46
Эйкозапентаеновая 20:5 ω 3 (ЭПК)	12,39
Гейкозапентаеновая 21:5 ω 3	0,21
Цис-6-Докозатетраеновая 22:4 ω 6	0,18
Клупанодоновая 22:5 ω 3	4,74
Цервоновая 22:6 ω 3 (ДГК)	20,29
Полиненасыщенные	45,87
Сумма ω 3	41,23
Сумма ω 6	2,99
Сумма ЭПК и ДГК	32,68

Анализ представленных результатов показывает, что, в исследуемом вторичном сырье полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) составляют 46,18 % от суммы жирных кислот. При этом следует отметить, что 21,49 % от общей суммы жирных кислот составляют насыщенные жирные кислоты.

Высокой биологической ценностью обладает основная группа ПНЖК семейства ω3. Докозагексаеновая кислота и эйкозапентаеновая кислота являются незаменимыми ПНЖК семейства ω3 ПНЖК. Такие жирные кислоты оказывают противовоспалительное действие, уменьшают риск возникновения онкологических заболеваний, повышают иммунитет организма, обеспечивает биологическую ценность исследуемого материала [3]. Однако при дальнейшем использовании исследуемого вторичного сырья ПНЖК в присутствии кислорода окисляются и способствуют появлению токсичных веществ и порочащих признаков материала. В связи с чем целесообразно предотвратить окисление липидов данного материала на ранних стадиях технологического процесса.

Для подтверждения рациональности использования хитозана для обезжиривания отходов икорного производства, снижения их способности к окислению определяли кислотное число в образцах, представленных в таблице 2, в течение 30 суток хранения при температуре 5°С. В процессе эксперимента было получено 6 опытных образцов с отличающимся составом. В качестве контроля выбран образец измельченных отходов икорного производства, содержащий 1% поваренной соли. Известно, что накопление продуктов гидролиза белков в 1 %-ом растворе поваренной соли увеличивает выход продуктов гидролиза в три раза, поскольку раствор поваренной соли обеспечивает максимальное фермент-субстратное взаимодействие. Поскольку в дальнейшем предполагается биомодификация вторичного сырья путем использования ферментативного гидролиза, то поваренную соль внесли в минимальном 1-2 %-ом количестве на начальном этапе технологического воздействия.

В остальные образцы, помимо соли, добавляли хитозан и его ПЭК с альгинатом натрия в разном количестве.

Состав опытных образцов отходов икорного производства

№ образца	Количество (г) пленок	Наименование компонента	Количество (г) компонентов
1	100	Поваренная соль	1
2	100	Поваренная соль и хитозан	1 и 1
3	100	Поваренная соль, хитозан и альгинат натрия	1, 1 и 1
4	100	Поваренная соль, хитозан и альгинат натрия	1, 2 и 2
5	100	Поваренная соль и хитозан	2 и 2
6	100	Поваренная соль и хитозан	2 и 3

Результаты определения кислотного числа в образцах в течение 30 суток их хранения представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты определения кислотного числа, мг КОН в опытных образцах

№ образца	Продолжительность хранения, сутки		
	10	20	30
1	0,76	1,67	4,60
2	0,54	1,07	3,15
3	0,50	1,05	2,91
4	0,41	0,96	1,45
5	0,43	0,98	1,40
6	0,40	0,94	1,39

Как видно из полученных результатов наличие хитозана в составе образцов влияет на процесс гидролиза липидов. При увеличении количества хитозана в образцах 4 и 5 (до 2 %) его действие более эффективно. В данных образцах после месяца хранения кислотное число меньше в 3 раза, чем в контроле. Дальнейшее увеличение содержания хитозана в образцах вторичного сырья не дает значительного положительного эффекта. При этом 3 %-ое содержание биополимера в образце определяется как органолептически негативное, поскольку увеличивается вязущий вкус хитозана.

Полученный результат имеет научное и практическое значение, поскольку кислотное число показывает степень гидролиза жира на свободные кислоты, которые при дальнейшем хранении окисляются и делают жир непригодным для пищевых целей. Прямая зависимость снижения этого показателя при увеличении концентрации хитозана вполне закономерна. Наличие же аниона альгината натрия в составе ПЭК хитозана в условиях данного эксперимента существенно не влияет на глубину гидролиза жира. В связи с чем рациональным представляется использование 2 % хитозана и 1 % поваренной соли для снижения способности образцов исследуемого вторичного сырья к окислению липидов.

Выводы

Таким образом, экспериментально подтверждено, что при получении биологически ценной продукции из отходов икорного производств, образующихся при пробивке ястыков лососевых рыб, целесообразно вносить биополимер хитозан в качестве антиокислителя с целью предотвращения окисления жира и снижения качества конечного готового продукта. Рациональным является использование низкомолекулярного водорастворимого хитозана в виде 2%-ого раствора в присутствии 1 % поваренной соли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимова С.Н., Полещук Д.В., Подленный Л.Ю., Пономаренко С.Ю., Горячева Е.Д. Технологические перспективы и технические решения сбора и использования отходов при производстве икры лососевых рыб. // Пищевая промышленность. – 2022. – № 2. – С. 45-47.

2. Максимова С.Н., Полещук Д.В., Пономаренко С.Ю., Баштовой А.Н., Горячева Е.Д. Оценка технологического потенциала отходов от переработки тихоокеанских лососей // Пищевая промышленность. – 2021. – № 11. – С. 96-99.

3. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации: Методические рекомендации. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 72 с.

4. Максимова, С.Н. Хитиновые материалы в технологии водных биоресурсов / С.Н. Максимова, Т.М. Сафронова, Д.В. Полещук. – СПб.: Лань, 2017. – 176 с.

5. Максимова С.Н., Сафронова Т.М., Полещук Д.В. Хитиновые материалы в технологии водных биоресурсов – СПб: Лань, 2017. – 176с.

6. Максимова С.Н., Сафронова Т.М. Хитозан в технологии рыбных продуктов: характеристики, функции, эффективность: моногр. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2010. – 256с.

APPLICATION OF CHITOSAN IN PRE-TREATMENT OF WASTE OF CAVIAR PRODUCTION

¹Maksimova Svetlana Nikolaevna, Dc. Sc. Engineering, Prof.

²Poleschuk Denis Vladimirovich, Cand. Sc. Engineering, Assoc. Prof.

³Podlenniy Lev Yurievich, graduate student

FESTFU "Dalrybvtuz", Vladivostok, Russia, e-mail: ¹maxsvet61@mail.ru

Information is presented on the high technological potential of waste generated during the punching of salmon ovaries. The prospects for the use of chitosan biopolymer to prevent the oxidation of the investigated secondary raw materials in the production of biologically valuable products from it are considered.

УДК 628.355.3

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОМИЦИНА В РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ НА ВИДОВОЙ СОСТАВ АКТИВНОГО ИЛА

¹Машенко Зинаида Евгеньевна, канд. фармацевт. наук, доцент

²Русских Яна Маратовна, магистрант

³Бахарев Владимир Валентинович, директор

^{1,2,3}ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет»,

Высшая биотехнологическая школа, Самара, Россия, e-mail: ¹mzinaida@yandex.ru

Антибиотикорезистентность становится одной из самых распространенных проблем современного мира. Одной из причин ее возникновения является неполная очистка сточных вод фармацевтических предприятий. Остатки антимикробных средств, попадающих в резервуары с активным илом, способствуют снижению качества очищаемой воды и нарушению работы данного биоценоза. Представлены результаты влияния эритромицина в различных лекарственных формах на видовой состав активного ила.

В связи с развитием предприятий фармацевтической промышленности, которые постоянно наращивают производственные мощности по выпуску антимикробных препаратов, образуются

сточные воды, в которых в больших количествах содержатся лекарственные средства, главным образом представленные антибиотиками. Высокая техногенная нагрузка, оказывающая непосредственное влияние на существующие экосистемы, приводит к развитию устойчивости различных микроорганизмов к антимикробным лекарственным препаратам, что создает серьезные риски для здоровья человека и целостности природного сообщества.

Устойчивость к антибиотикам стала глобальной проблемой здравоохранения, поскольку бактерии, вызывающие инфекции становятся устойчивыми к наиболее распространенным антибиотикам, что приводит к удлинению времени выздоровления и риску смертности. К тому же резистентность у некоторых бактерий развивается к различным классам антибиотиков, что вынуждает вносить дополнительные расходы в разработку более эффективных лекарственных средств.

В целях предотвращения развития антибиотикорезистентности у бактерий необходимо применять селективную и эффективную очистку сточных вод, однако даже благодаря постоянному усовершенствованию установок по очистке воды, справиться с подобного рода химическими веществами могут немногие фильтры для воды. [1].

Одним из самых эффективных и не дорогостоящих методов очистки, в настоящее время, является биологический метод очистки сточных вод, в частности очистка активным илом. Активный ил представляет собой биоценоз различных организмов, которые способны очищать органические загрязнения из сточных вод. Антибиотические препараты, попадающие в ходе очистки сточных вод в аэротенки, способны нарушать целостность и работоспособность данного сообщества организмов.

Цель работы – изучение влияния различных лекарственных форм эритромицина на видовой состав активного ила.

В эксперименте использовали активный ила аэротенков Самарских городских очистных сооружений.

Три пробы активного ила по 200 см³ помещали в химические стаканы и инкубировали в течение 72 ч при комнатной температуре (25 °С) с аэрацией. В две пробы каждые 24 ч вносили водные растворы лиофильного порошка и таблеток эритромицина в концентрации 100 мг на 1 г активного ила, третья проба (контрольная) - без антибиотика.

При изучении видового состава биоценоза активного ила учитывалось количество гидробионтов и их общее состояние. Наблюдение за ходом эксперимента осуществляли с помощью микроскопирования препаратов «Раздавленная капля» контрольной и опытных проб каждые 24 ч при увеличении 1000X [2]. Принцип определения количества гидробионтов по балльной системе заключается в оценке численности организмов активного ила по условной балльной шкале. Каплю тщательно перемешанной суспензии активного ила, объемом около 0,1 см³, помещали на предметное стекло и накрывали покровным. Препарат подвергали микроскопированию при увеличении 1000X детали рассматривали при больших увеличениях. Изучению подвергали 40 полей зрения, при зигзагообразном перемещении аппарата, для достижения полного охвата материала [3].

Из каждой - пробы отбирали не менее двух капель суспензии. Учитывали все встречающиеся организмы.

При микроскопировании в большом количестве были обнаружены следующие организмы (рис. 1): *Vorticella Convallaria*, *Epistylis Plicatilis*, *Notommata Ansata*, *Opercularia*, *Testacea*, нитчатые бактерии, *Amoeba*, *Nematoda*.

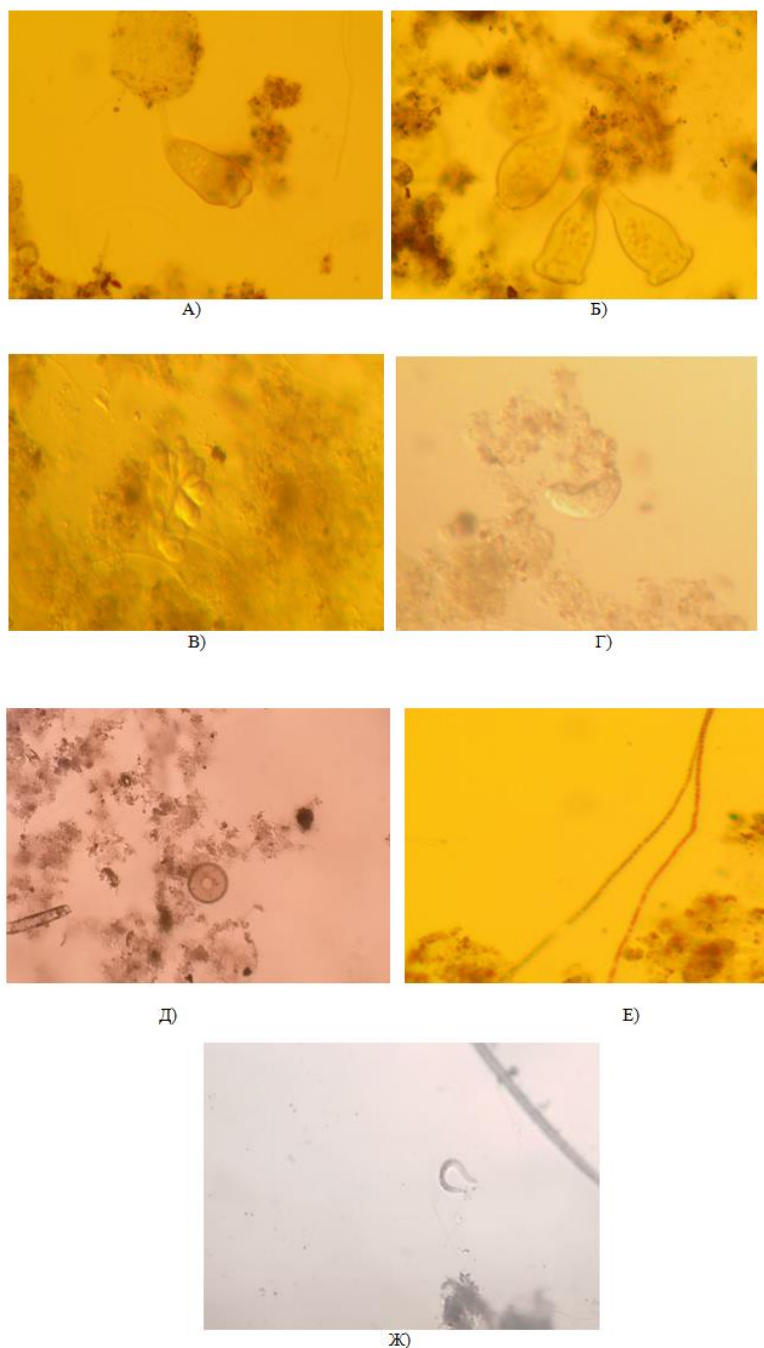


Рис. 1. Гидробионты активного ила (препарат «Раздавленная капля», увеличение 1000х):
 А) *Vorticella convallaria*; Б) *Epistylis plicatilis*; В) *Rotaria*; Г) *Opercularia*;
 Д) *Testacea*; Е) нитчатые бактерии; Ж) *Nematoda*

Данные о влиянии различных лекарственных форм эритромицина на видовой состав активного ила представлены в табл. 1

Таблица 1

Видовой состав биоценоза активного ила при добавлении эритромицина

Время, ч	Организмы активного ила	Контрольная проба	Проба с внесением эритромицина в форме таблеток	Проба с внесением эритромицина в форме лиофильного порошка
24	<i>Amoeba</i>	п	п	п
	<i>Testacea</i>	п	р	ед
	<i>Aspidisca</i>	–	–	–
	<i>Epistylis</i>	п	п	–
	<i>Vorticella</i>	п	р	ед
	<i>Lecane</i>	–	–	–

	<i>Rotaria</i>	п	п	м	
	Нитчатые бактерии	–	–	ед	
	<i>Nematoda</i>	ед	–	–	
48	<i>Amoeba</i>	п	п	м	
	<i>Testacea</i>	–	ед	ед	
	<i>Aspidisca</i>	–	–	–	
	<i>Epistylis</i>	п	р	–	
	<i>Vorticella</i>	п	ед	–	
	<i>Lecane</i>	ед	–	–	
	<i>Rotaria</i>	п	п	ед	
	Нитчатые бактерии	–	м	–	
	<i>Nematoda</i>	ед	–	–	
	72	<i>Amoeba</i>	п	п	м
		<i>Testacea</i>	–	–	ед
<i>Aspidisca</i>		ед	–	–	
<i>Epistylis</i>		м	ед	–	
<i>Vorticella</i>		м	ед	–	
<i>Lecane</i>		ед	–	–	
<i>Rotaria</i>		п	м	–	
Нитчатые культуры бактерий		м	п	м	
<i>Nematoda</i>		–	–	–	

Примечание: "ед" - единично; "м" - мало; "п" - порядочно; "–" – отсутствуют

В контрольной пробе в течение всего периода инкубации наблюдался удовлетворительный видовой состав активного ила. Так, среди различных видов инфузорий доминирующими для предоставленного активного ила являлись представители родов *Opercularia*, *Epistylis* и *Vorticella*, которые характеризуют своим наличием хорошую очистку. Активность работы инфузорий напрямую зависит от условий их существования (рис. 1 – А, Б, Г). В активном иле встречались в большом количестве колوراتки (рис. 1 – В). Они являются чувствительными индикаторными организмами, свидетельствующими как о приемлемой очистке, так и о нарушении работы очистных сооружений. В особенности это зависит от интенсивности процессов нитрификации. Также присутствовали раковинные амебы (*Testacea*), что также свидетельствует о удовлетворительном функциональном состоянии активного ила (рис.1 – Д). Большое количество представителей рода амеб говорит о низкой эффективности биологической очистки, а присутствие в небольшом количестве крупных амеб – показатель хорошей очистки. Круглые черви могут развиваться в хорошо работающем иле, их малое количество указывает на залеживание, плохое перемешивание активного ила или недостаточную аэрацию (рис. 1 – Ж). К концу эксперимента наблюдали нитчатые бактерии, которые свидетельствуют о ухудшении гидрохимических свойств активного ила (рис. 1 – Е).

В опытных пробах в течение всего периода инкубации видовой состав биоценоза активного ила уменьшался, также снижалась подвижность живых организмов активного ила. Особенно это было заметно в образце с порошком эритромицина.

В первые 24 ч инкубации при однократном введении водных растворов лиофильного порошка и таблеток эритромицина организмы надилловой жидкости обнаруживались в меньших количествах по сравнению с контрольной пробой. Также было отмечено замедление активности организмов, повреждение раковин у раковинных амеб.

Через 48 ч инкубации в образцах с добавлением антибиотика из живых организмов были обнаружены только представители *Rotaria*. Их активность была значительно ниже, чем в первые сутки эксперимента.

Через 72 ч эксперимента в образце, эритромицин в котором был добавлен в виде водного раствора лиофильного порошка, живых организмов обнаружено не было. В образце с водным раствором таблеток эритромицина оставалось малое число малоподвижных *Rotaria*.

Таким образом, эритромицин в различных лекарственных формах негативно влияет на биоценоз активного ила. Порошок эритромицина значительно уменьшает количество и разнообразие организмов активного ила по сравнению с таблетированной формой эритромицина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батуева А.М., Дягелев М.Ю. Анализ содержания антибиотиков в городских сточных водах // Химия. Экология. Урбанистика. – 2018. – Т. 2018. – С. 205-210.
2. Капитонова Г. В. Методические рекомендации по проведению гидробиологического контроля очистки сточных вод с активным илом // М.: Витак. – 2012. – 43 с.
3. Козлов М.Н., Дорофеев А.Г., Асеева В.Г. Микробиологический контроль активного ила биореакторов очистки сточных вод от биогенных элементов – М.: Наука, 2012. – 80 с.

INFLUENCE OF ERYTHROMYCIN IN VARIOUS DOSAGE FORMS ON THE SPECIES COMPOSITION OF ACTIVE SLUDGE

¹Mashchenko Zinaida Evgenievna, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Higher biotechnology school

²Russkikh Yana Maratovna, master student of the Higher school of biotechnology

³Bakharev Vladimir Valentinovich, Director of the Higher school of biotechnology

^{1,2,3}Samara State Technical University, Samara, Russia, e-mail: ¹mzinaida@yandex.ru

Antibiotic resistance is becoming one of the most common problems in the modern world. The main reason of its occurrence is the improper wastewater treatment in pharmaceutical enterprises. Residues of antimicrobial agents that enter activated sludge tanks contribute to decrease in the quality of treated water and the disruption of biocenosis. The paper presents the results of the effect of erythromycin in various dosage forms on the species composition of activated sludge.

УДК 664.38

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ ВТОРИЧНОГО ШПРОТНОГО СЫРЬЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ СОУСНОЙ ПРОДУКЦИИ

¹Мезенова Ольга Яковлевна, д-р техн. наук, профессор, зав. кафедрой

²Андреева Елизавета Васильевна, студентка направления «Биотехнология»

³Jörg-Thomas Mörsel, Dr. директор лаборатории UBF, Altlandsberg

^{1,2}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия, e-mail: ¹mezenova@klgtu.ru; ²andreeva.lizonka@gmail.com

³Научно-исследовательская и консультационная лаборатория, Альтландсберг, Германия, e-mail: ³thomas.moersel@ubf-research.com

Рассмотрено использование пептидных композиций, полученных при гидролизе копченых голов кильки, в рецептуре соусной продукции. Исследован аминокислотный состав пептидной добавки. Получены математические модели и разработаны рецептуры экспериментальных образцов соусов. Установлены высокие органолептические свойства соусной продукции. Определен химический состав соусов, доказана их безопасность по содержанию стеролов. Рассчитана функциональность продуктов по содержанию белка и бета-каротина. Предложены рекомендации по употреблению соусной продукции.

Актуальность. На сегодняшний день доказан дефицит качественного белка в рационе человека. При суточной норме в 70-90 г на человека среднее реальное потребление животного белка не превышает 60 г. На территории России потребление полноценных животных белковых продуктов снизилось на 25-35% [1, с. 215-219]. Калининград является рыбным регионом, в котором балтийская килька относится к одному из основных объектов промысла. В Калининградской области остро стоит вопрос о переработке отходов от производства консервов «Шпроты в масле», которые вырабатываются из кильки или салаки горячего копчения, предварительно обезглавленной. На основных производителях консервов «Шпроты в масле» в регионе – рыбоконсервном комплексе ООО «РосКон» и СПК «Рыболовецкий колхоз “За Родину”» – за сутки накапливается от 700 кг до 2 т копченых голов кильки, а в ближайшей перспективе их количество вырастет до 6-8 т/сут. Эти отходы не подлежат переработке на кормовую продукцию, поскольку они содержат коптильные компоненты, противопоказанные животным.

На кафедре пищевой биотехнологии предложены из данного сырья получать пептидные и белково-минеральные добавки методом глубокого гидролиза с применением высокотемпературной обработки. В пептидной добавке содержится до 90% низкомолекулярных пептидов с ММ менее 10 кДа, которые обладают особыми свойствами, высокой биологической активностью, проявляют тканеспецифичность, антисептические и антиоксидантные свойства. При этом они проявляют пластические функции, поскольку являются источниками аминокислот, участвующими в синтезе многих тканей, в том числе, опорно-двигательного аппарата. Данные характеристики обуславливают актуальность их использования во многих пищевых системах.

На территории Калининградской области произрастает облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides* L.), которая является источником ценного сырья для получения концентратов поливитаминов и важных лечебных препаратов. На сегодняшний день в Калининградской области полноценно не реализуется потенциал произрастающей облепихи, ограничен ассортимент производимой с ней продукции, хотя ее плоды можно назвать концентратом биологически активных компонентов, в том числе минорных парафармацевтиков [2, с. 44-51].

По статистике Минздрава РФ в среднем 60–80% населения России наблюдается дефицит витаминов в питании, к числу которых относится витамин А [3, с. 1]. Компенсировать данный недостаток можно введением в продукты бета-каротина, являющегося предшественником витамина А (ретинола), которым богаты ягоды облепихи. Бета-каротин обладает выраженными антиоксидантными свойствами, является биологически активным компонентом при синтезе витамина А, который играет важную роль в развитии лимфоцитов и реакции иммунной системы, необходим для поддержания работы клеток кожи, дыхательной и пищеварительной систем. Бета-каротин находится в жировой фракции облепихи, которая характеризуется высокой биологической ценностью, как природный концентрат витаминов. В облепиховом масле содержатся также токоферолы (витамин Е), которые являются активными натуральными антиоксидантами [4, с. 147-155].

Актуальной задачей современной пищевой биотехнологии является создание поликомпонентных пищевых продуктов массового потребления, обогащенных ценными биологически активными веществами, в том числе низкомолекулярными пептидами животного происхождения, минорными компонентами и витаминами облепихи, в том числе бета-каротином. К таким продуктам можно отнести соусы, обогащающие многие пищевые продукты специфическими свойствами. Соусы занимают привлекательную нишу на рынке пищевых продуктов, они не только улучшают вкусоароматические характеристики многих вторых блюд, но и возбуждают аппетит, что ведет к повышению усвояемости пищи в организме.

Целью исследования являлась разработка оригинальной рецептуры поликомпонентных соусов, обогащенных низкомолекулярными пептидами, полученными из голов копченой кильки, и облепиховым маслом, а также оценка сырьевого биопотенциала и обоснование его использования в соусной продукции.

Эксперименты проводили в научно-исследовательской лаборатории UBF Untersuchungs-, Beratungs-, Forschungslaboratorium GmbH в Альтлансберге, Германия.

При оценке биопотенциала сырья использовали следующие методики: метод Къельдаля для количественного определения белка в пробе [5]; гравиметрический метод и экстракция по Сокслету для определения содержания жира [6]; фотоколориметрический метод для определения содержания каротиноидов и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения стеролов.

В головах копченой кильки содержатся белки со всеми незаменимыми аминокислотами, уникальные жиры с полиненасыщенными жирными кислотами, витамины группы В, микроэлементы, нуклеиновые кислоты, водорастворимые азотистые соединения, полезные копильные компоненты, выполняющие в сырье функции консервантов, антиоксидантов, вкусоароматических добавок. Для использования биопотенциала шпротных отходов сырье измельчали, термически обрабатывали и фракционировали центрифугированием. При этом из рыбного сырья получали липидную (жировую верхнюю), пептидную (водную среднюю) и минерально-протеиновую (осадочную нижнюю) фракции [7, с. 1-23]. Пептидную и минерально-протеиновую фракции высушивали и использовали в эксперименте в виде пищевых добавок.

В экспериментах использовали облепиховое масло марки Alpvital, которое выполняло роль не только источника БАВ, но и носителя специфических вкусо-ароматических свойств соуса, а также компенсировало шпротные ароматы.

Результаты исследования С помощью метода Кьельдаля было оценено содержание белка в пептидной добавке и минерально-протеиновой добавке (таблица 1). Содержание белка в пептидной добавке на 33,6% выше, чем в нижней фракции, поэтому для обогащения соуса была выбрана именно пептидная добавка. Пробы были также проанализированы на содержание жира. В пептидной добавке жира на 61% меньше, поэтому для снижения калорийности соуса была выбрана именно эта добавка.

Таблица 1

Содержание белка и жира в шпротных добавках, г/100 г

Показатель	Пептидная добавка	Минерально-протеиновая добавка
Белок	81,37	60,91
Жир	4,23	11,02

Для оценки качества белка был проведен аминокислотный анализ пептидной добавки, показавший, что она богата всеми незаменимыми аминокислотами (таблица 2). Из заменимых аминокислот установлено повышенное содержание таурина (28,17%) и гистидина (13,27%), которые имеют важное физиологическое значение. Таурин образует в печени с жёлчными кислотами конъюгаты, которые входят в состав жёлчи, и, будучи поверхностно-активными веществами, способствуют эмульгированию жиров в кишечнике. Гистидин входит в состав активных центров множества ферментов и является предшественником в биосинтезе гистамина [8, с. 14-21].

Таблица 2

Аминокислотный состав пептидной добавки

Аминокислоты	Содержание, г/100г белка
Аланин	9,56
Аргинин	1,13
Аспарагин	0,29
Аспарагиновая кислота	1,11
Глютамин	1,18
Глютаминовая кислота	2,95
Глицин	3,22
Гистидин	13,27
Изолейцин	1,62
Лейцин	2,77
Лизин	3,93
Метионин	0,84
Орнитин	0,71
Фенилаланин	1,4
Пролин	1,26
Серин	2,26
Таурин	28,17
Треонин	1,73
Тирозин	1,55
Валин	2,42

В качестве основы для соуса была взята классическая рецептура из пшеничной муки и сливок [9]. Рецептура этого соуса была взята в качестве контроля.

В экспериментальных рецептурах проектируемого соуса использовали ржаную муку вместо пшеничной. Предварительно провели сравнение химического состава образцов пшеничной и ржаной муки (таблица 3). Для уменьшения калорийности и увеличения содержания пищевых волокон для опытных образцов соуса была выбрана ржаная мука.

Таблица 3

Сравнительные характеристики основных показателей химического состава пшеничной и ржаной муки [10]

Показатель	Пшеничная мука	Ржаная мука
Калорийность, ккал/100г	334	298
Белок, г/100г	10,8	8,9
Жир, г/100г	1,3	1,7
Углеводы, г/100г	69,9	61,8
Пищевые волокна, г/100г	3,5	12,4

Для определения оптимальной рецептуры соуса использовали математическое моделирование, а именно метод планирование эксперимента и оптимизация биотехнологического процесса изготовления продукта с применением ортогонального центрального композиционного плана 2-го порядка для двух факторов. В качестве изменяемых факторов были выбраны: X1 - масса пептидной добавки (г/100г) с интервалом варьирования 2 г/100г и X2 - масса ржаной муки (г/100г) с интервалом варьирования 0,5 г/100г. Пептидная добавка влияет непосредственно на вкусоароматические характеристики готового продукта, а содержание ржаной муки - на консистенцию соуса. В качестве параметра оптимизации (Y) использовали органолептическую оценку с 5-балловой шкалой и шагом от 1 до 5.

Составив план эксперимента по матрице выбранного плана, проведя эксперимент, были получены количественные значения параметра оптимизации, с применением которых по алгоритмам плана была рассчитана математическая модель в кодированном виде:

$$Y = 0,042 + 0,42X1 - 0,5 \cdot X1 \cdot X2 + 2,79 \cdot X1^2 + 1,35 \cdot X2^2$$

Адекватность модели была установлена по критерию Фишера. Проанализировав кодированную математическую модель, можно сделать вывод, что общая органолептическая оценка продукта зависит больше от фактора X1 – массы пептидной добавки.

Переход кодированной модели рецептуры соуса позволил получить его математическое выражение в натуральном виде:

$$Y = 0,70M_t^2 + 5,4M_m^2 - 0,5M_t \cdot M_m - 9,7 \cdot M_t - 22,9 \cdot M_m + 66,6;$$

где M_t – масса пептидной добавки, M_m – масса муки.

На основании натуральной модели методом ее дифференцирования были найдены оптимальные значения дозировок пищевых ингредиентов в соусе: масса пептидной добавки - 8 г/100г; масса муки - 2,5 г/100г.

В результате испытаний было приготовлено 5 опытных образцов:

- контроль, содержащий пшеничную муку и сливки;
- пептидный соус из ржаной муки, сливок и пептидной добавки;
- облепихово-пептидный соус с добавлением облепихового масла;
- облепихово-пептидный соус в разведении с водой 50:50;
- облепихово-пептидный соус в разведении с водой 70:30.

Рецептуры разработанных соусов представлены в таблице 4

**Рецептуры разработанных соусов с применением пептидной шпротной добавки,
в г на 100 г соуса**

	Контроль	Пептидный соус	Облепихово-пептидный соус	Облепихово-пептидный соус в разведении с водой 50:50	Облепихово-пептидный соус в разведении с водой 70:30
Пшеничная мука	2	-	-	-	-
Ржаная мука	-	2,5	2,5	2,5	2,5
Масло сливочное 72,5%	5	2	2	2	2
Сливки 10%	93	34,7	64,7	24,7	39,7
Пептидная добавка	-	8	8	8	8
Облепиховое масло	-	-	20	10	15
Вода	-	50	-	50	30
Соль	-	0,2	0,2	0,2	0,2
Перец Чили	-	0,2	0,2	0,2	0,2
Лимонный сок	-	2	2	2	2
Орегано	-	0,2	0,2	0,2	0,2
Базилик	-	0,2	0,2	0,2	0,2

Технология производства экспериментальных образцов соусов включала следующие операции: приемка и оценка качества сырья; учет количества сырья; растапливание сливочного масла, растворение в жировой фракции муки, смешивание со сливками, измельчение пептидной добавки со специями, смешивание всех ингредиентов, гомогенизация соуса, охлаждение, упаковка и маркировка продукта.

В таблице 5 представлены экспериментальные данные по органолептической оценке и содержанию белка и жира в полученных образцах соуса.

Из данных таблицы 5 видно, что разработанные соусы имеют однородную текстуру, консистенция от густой до жидкой в зависимости от разведения, вкус и аромат у всех соусов приятный, копченый, у облепихового соуса приятная кислинка.

Данные соуса рекомендуется употреблять к рыбным блюдам, гарнирам, салатам в качестве дополнительного источника аминокислот животного происхождения, витаминов и каротиноидов. Рекомендуемые количества суточного потребления - до 200г. В случае превышения дансуточной нормы будет иметь место пролонгированное обеспечение функций БАВ-ми.

Таблица 5

**Органолептическая характеристика и содержание белка и жира
в разработанной соусной продукции, г/100г**

Образец соуса	Органолептическая оценка	Белок	Жир
Контроль	Текстура однородная, густая, цвет молочный, по вкусу жирный, сливочный	2,76	12,95
Пептидный соус	Текстура однородная, более жидкая, цвет бежевый, аромат копчености с приятным привкусом копченой рыбы	7,63	5,04
Облепихово-пептидный соус	Текстура однородная, густая, цвет ярко-оранжевый, легкий аромат копчености, яркий кисловатый привкус облепихи	12,89	16,59
Облепихово-пептидный соус, разведение 50:50	Текстура однородная, жидкая, цвет светло-оранжевый, легкий аромат копчености, кисловатый привкус облепихи	5,49	10,65
Облепихово-пептидный соус, разведение 70:30	Текстура однородная, не густая, цвет оранжевый, легкий аромат копчености, кисловатый привкус облепихи	9,19	13,62

Анализ химического состава соусов показывает, что пептидная добавка обогатила соус белковыми компонентами относительно контрольного соуса. В пептидном соусе содержание белка увеличилось почти в 3 раза. В облепихово-пептидном соусе за счет увеличенной концентрации содержания белка выросло почти в 5 раз, а с дальнейшими разведениями уменьшалось примерно на 30%.

Суточная потребность человека в белке составляет от 75 до 114 г/сутки для мужчин и от 60 до 90 г/сутки для женщин [11, с.6-7]. Если взять усредненное значение 80 г/сутки, то облепихово – пептидный соус будет являться функциональным по содержанию белка, так как в 100г соуса содержится 16% суточной нормы белка.

Для облепиховых соусов было определено содержание каротиноидов (таблица 6).

Таблица 6

Содержание каротиноидов в разработанной соусной продукции, мг/100г

	Общее содержание каротиноидов	Бета-каротин
Облепихово-пептидный соус	9,48	3,36
Облепихово-пептидный соус, 50:50	3,28	1,16

Физиологическая потребность бета-каротина для взрослых – 5 мг/сутки [11, с.30-31]. По содержанию каротиноидов можно сделать вывод, что облепиховые соусы без и с разведением являются функциональными продуктами по содержанию бета-каротина, так как его количество в суточной порции составляет свыше 15% от физиологической суточной нормы.

Безопасность разработанных соусов проверяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по содержанию стеролов (таблица 7).

Таблица 7

Содержание стеролов в разработанной соусной продукции

	Брассикастерол, мг/100г	Кампестерол, мг/100г	Стигмастерол, мг/100г	Бета-ситостерин, мг/100г	Холестерол, мг/100г
Пептидный соус	0	0,44	0	0	2,15
Облепихово-пептидный соус, 50:50	0	0	0	0	0,17

Количество холестерина, поступающего с пищей, в суточном рационе взрослых и детей не должно превышать 300 мг. Адекватные уровни потребления установлены для β-ситостерина, β-ситостерола-D-гликозида и стигмастерина и составляют 100 мг в сутки (для каждого) [11, с.24-25]. Пептидный и облепихово-пептидный соусы не нарушают данных требований и могут быть обосновано названы не только биологически ценными, но и безопасными по содержанию стеролов.

Выводы

Разработаны оригинальные рецептуры поликомпонентных сливочных соусов, обогащенных низкомолекулярными пептидами, полученными из голов копченой кильки, и облепиховым маслом. Оценен биопотенциал использованных пищевых компонентов и обосновано их применение в соусной продукции.

С помощью математического моделирования разработаны оптимальные дозировки пептидной добавки и ржаной муки для рецептуры пептидного и облепихово-пептидного соусов в различных разведениях.

Установлены высокие органолептические свойства и биопотенциал по содержанию в экспериментальных образцах соусов белка, жира и бета-каротина. Доказано практическое отсутствие в готовых продуктах холестерина и других стеролов.

Пептидный соус и облепихово-пептидный соус рекомендуются к пищевому использованию в

качестве дополнения к готовым блюдам для придания характерных вкусо-ароматических характеристик, а также для украшения разных пищевых продуктов.

Разработанные соусы рекомендуются к потреблению широкими слоями населения, а также людьми, страдающими недостатком белка и витамина А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быковская Е.И., Минакова И.В. Обогащение продуктов питания белками, микронутриентами как основа оптимизации рациона питания населения // Молодежь и XXI век. - Курск: Закрытое акционерное общество "Университетская книга", 2019. - С. 215-219.
2. Мерзель Й.-Т., Воронцов С.А., Воронцов П.А., Мезенова О.Я. Оценка биопотенциала дикорастущей облепихи и перспектив ее комплексного использования // Вестник МАХ, 2020. - № 3. - С. 44-51/
3. Авитаминоз: профилактика и лечение // МинЗдрав URL: <https://www.minzdravrd.e-dag.ru> (дата обращения: 02.09.2022).
4. Земцова А.Я., Зубарев Ю.А., Гунин А.В. Токоферолы плодовой мякоти четырех подвидов облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.) в условиях лесостепи Алтайского края // Химия растительного сырья. - 2019. - №1. - С. 147-155.
5. Метод Кьельдаля: сущность, стандарты, образцы, оборудование // NV-Lab URL: <https://www.nv-lab.ru/issues.php?ID=33> (дата обращения: 02.09.2022).
6. Методы определения жира в пищевых продуктах // Pandia URL: <https://pandia.ru/text/77/483/45648.php> (дата обращения: 02.09.2022).
7. Патент РФ 2681352 Способ получения пищевых добавок из вторичного рыбного сырья с применением гидролиза/О.Я.Мезенова, С.В.Агафонова, Л.С. Байдалинова, Л.В.Городниченко, В.В.Волков, Н.Ю.Мезенова, Т.Гримм, А.Хелинг
8. Проскурина И.К. Биохимия. - М.: ВЛАДОС-ПРЕСС, 2003. - 237 с.
9. Сливочный соус // Кулинария URL: <https://kylinariya.ru/slivochnyy-sous> (дата обращения: 02.09.2022).
10. Химический состав пшеничной и ржаной муки // Vuzlit URL: https://vuzlit.com/1288893/himicheskiy_sostav_pshenichnoy_rzhanoy_muki (дата обращения: 02.09.2022).
11. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации "Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации" от 2021 № МР 2.3.1.0253-21

JUSTIFICATION OF THE ADOPTATION OF LOW-MOLECULAR PEPTIDES OF SECONDARY FISH RAW MATERIALS. PROSPECTS OF THEIR USE IN THE SOUCE PRODUCTION

¹Mezenova Olga Yakovlevna, doctor of technical Sciences, professor,
Head of the Department of Food Biotechnology

²Andreeva Elizaveta Vasilevna, studentspecialty Biotechnology

³Dr. Jörg-Thomas Mörsel, director of the laboratory

^{1,2}Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia,
e-mail: ¹mezenova@klgtu.ru; ²andreeva.lizonka@gmail.com

³Untersuchung-, Beratungs-, Forschungslabor GmbH, Altlandsberg, Germany,
e-mail: ³thomas.moersel@ubf-research.com

The use of peptide compositions obtained by hydrolysis of smoked sprat heads in the formulation of sauce products is considered. The amino acid composition of the peptide supplement was investigated. Mathematical models were obtained and formulations of experimental samples of sauces were developed.

High organoleptic properties of sauce products have been established. The chemical composition of sauces has been determined, their safety in terms of sterols content has been proven. The functionality of the products in terms of protein and beta-carotene content is calculated. Recommendations on the use of sauce products are offered.

УДК 639.3

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НЕРАСТВОРИМЫХ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА ШПРОТНЫХ ОТХОДОВ В КОМБИКОРМАХ ДЛЯ ЛОСОСЕВЫХ

¹Мезенова Ольга Яковлевна, д-р техн. наук, профессор, зав. кафедрой

²Пьянов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук, начальник сектора аквакультуры

³Агафонова Светлана Викторовна, канд. техн. наук, доцент

⁴Романенко Наталья Юрьевна, канд. техн. наук, доцент

⁵Волков Владимир Владимирович, зам. директора технопарка КГТУ

⁶Калинина Наталья Сергеевна, зав. лабораториями

^{1,3,4,5,6}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия, e-mail: ¹mezenova@klgtu.ru; ³svetlana.agafonova@klgtu.ru;

⁴nataliya.mezenova@klgtu.ru; ⁵vladimir.volkov@klgtu.ru; ⁶natalya.kalinina@klgtu.ru

²ФГБНУ «ВНИРО» Атлантический филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АтлантНИРО»), Калининград, Россия, e-mail: ²ryanov@atlantniro.ru

Обсуждены проблемы современного развития в России индустриальной аквакультуры лососевых, связанные с кормопроизводством. Показана перспективность использования в составе комбикормов нерастворимых продуктов гидролиза шпротных отходов в качестве источника протеиновых и минеральных компонентов. Получены положительные результаты в биологических испытаниях по выращиванию мальков сиговых с применением экспериментальных комбикормов. Приведены результаты биологических испытаний выращивания мальков сиговых с применением комбикормов, полученных путем внесения 10% водонерастворимой белково-минеральной добавки вместо такого же количества рыбной муки.

Индустриальная аквакультура лососевых относится к наиболее динамично развивающемуся сектору рыбного хозяйства. Одним из основных факторов ее позитивного развития является обеспечение качественными сбалансированными по ключевым веществам комбикормами. Традиционно в составе комбикорма для лососевых основным компонентом является рыбная мука, как источник белка и минеральных веществ. В настоящее время из-за дефицита качественной рыбной муки ведутся поиски альтернативных и в то же время доступных источников белка, основным требованием к которым является адекватная питательная ценность. Для получения белково-минеральных добавок применяются дрожжи, различные растения (бобовые, зерновые), насекомые, черви, личинки, термиты, отруби, жмых масличных культур, отходы пищевой промышленности и другие источники [1, 2].

В Калининградской области представляется целесообразным использование в составе комбикормов для лососевых гидролизатов из отходов шпротного производства – голов копченой кильки. Данное предложение обусловлено повышенными количествами остающихся в производстве шпрот неперерабатываемых голов копченой кильки и высоким содержанием в них ценных питательных веществ [3,4].

На кафедре пищевой биотехнологии КГТУ из шпротного вторичного сырья по разработанной и запатентованной технологии с использованием высокотемпературного гидролиза получают два вида кормовых добавок – сублимированные водорастворимые протеиновые добавки и сушеные

водонерастворимые белково-минеральные добавки. Достоинствами водорастворимой добавки является высокое содержание в ней белка (более 80%), при этом основными ее компонентами являются низкомолекулярные пептиды с молекулярной массой от 5 до 100 кДа (более 90%), характеризующиеся повышенной усвояемостью и физиологической активностью [5,6]. Ключевым преимуществом качества водонерастворимой добавки является высокое содержание высокомолекулярного белка (более 50%), выполняющего физиологическую функцию пищевых волокон животного происхождения, и значительное содержание кальция и фосфора (более 20% в сумме), необходимых растущим организмам для построения опорно-двигательного аппарата [4].

Получаемые из шпротных голов биокомпоненты являются прекрасным пластическим и энергетическим материалом, потенциально полезным для рыб в аквакультуре. Актуальность их использования в качестве кормовых добавок основана на перспективности совершенствования региональной аквакультуры, как компонента стратегии развития Калининградской области.

В составе комбикормов протеиновая сублимированная протеиновая добавка обладает улучшенными функциональными свойствами и биологической эффективностью. Положительное влияние на биологические показатели роста мальков сиговых были отмечены при включении в состав комбикормов 5% водорастворимой протеиновой добавки, полученной при гидролизе шпротных голов [7]. Данный эффект обусловлен высокой биологической эффективностью пептидных компонентов, характеризующихся минимальной молекулярной массой и ценным аминокислотным составом. Они рекомендуются к применению в качестве источника быстро усваиваемых и физиологически активных аминокислот в составе комбикормов в аквакультуре. Однако исследований по применению нерастворимых в воде компонентов, образующихся в качестве осадочного остатка при гидролизе голов копченой кильки, еще не проводилось.

Целью данных исследований являлся анализ физиологической ценности кормовой нерастворимой в воде добавки, полученной методом глубокого термического гидролиза шпротных отходов, а также оценка перспективности ее применения в составе комбикормов для лососевых рыб в аквакультуре.

При проведении экспериментов использовали отходы шпротного производства ГК «За Родину» одной партии выработки.

Гидролиз шпротных голов проводили в Центре передовых технологий использования белка по рациональным режимам высокотемпературного термогидролиза [4]. Нерастворимую осадочную фракцию высушивали конвекционным способом при 85°C до постоянной влажности (5-7%), после чего тонко измельчали.

Для получения комбикормов использовали специальный гранулятор кормов, в который последовательно вводили компоненты по рецептуре ФАО (рыбная и пшеничная мука, белково-минеральная добавка, рыбий жир, карбоксил-метил-целлюлоза (КМЦ), витаминно-минеральный премикс, желатин) в определенной последовательности при тщательном перемешивании. При изготовлении экспериментальных кормов 10% рыбной муки заменяли на 10% шпротной добавки. Одновременно изготавливали корма без шпротной добавки (контроль).

Подготовленные корма в виде гранул с диаметров 2-3 мм, в состав которых вводили добавку из шпротных отходов, были испытаны в специальных биологических экспериментах по выращиванию мальков сиговых в течение 56 суток в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ), при этом в 3-х установках малькам давали стандартный корм (контроль), а в трех других установках - экспериментальный корм (эксперимент).

Химический состав добавок и комбикормов определяли стандартными методами (по ГОСТ 7636-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа»). Содержание общего и небелкового азота оценивали по методу Кьельдаля на приборе «Kjeltec 2300».

Содержание аминокислот в белках белково-минеральной добавки, а также минеральный состав белково-минеральной фракции оценивали по арбитражным методикам России (ГОСТ 32195-2013) и ЕС (ISO 13903:2005, UBF, Германия, Альтландсберг)

Биологические испытания кормовых добавок в аквакультуре проводили на опытной базе Атлантического филиала ФГУП «ВНИРО» (АтлантНИРО) при выращивании мальков сиговых рыб в установках замкнутого водоснабжения (п. Лесное, Зеленоградский район).

Белково-минеральная добавка представляет собой тонко дисперсный порошок коричневого цвета, с приятным шпротным ароматом и специфическим вкусом, свойственный копченым сельдевым рыбам. Она рекомендуется к введению в состав комбикормов рыб в аквакультуре в качестве источника высокомолекулярных белков.

Результаты исследования показали, что в белково-минеральной добавке содержание воды составляет 8,0%, протеина - 60,9%, жира - 11,0%, минеральных веществ -20,1%. В экспериментальных образцах комбикорма содержание воды составило 9,1%, белка - 41,9%, жира 22,0%, минеральных веществ – 27,0%. В контрольном образце корма установлен следующий химический состав: воды – 8,9%, белка - 39,7%, жира - 20,1%, минеральных веществ – 31,3 %. Таким образом, внесение 10% белково-минеральной добавки в комбикорма повышает в них содержание белка и минеральных веществ.

Компонентный состав экспериментальных и контрольных комбикормов, соответствующий рекомендуемому набору ФАО для лососевых в аквакультуре, приведен в таблице 1. Наряду с компонентами животного происхождения в комбикормах обязательными составляющими являются пшеничная мука (18-20%), карбоксил-метил-целлюлоза (КМЦ) (1,8-2,0%) и витаминно-минеральный премикс (0,9-1,0%). Рыбоводные показатели сравнительного выращивания мальков сиговых в УЗВ-установках с применением контрольных и экспериментальных комбикормов показаны в таблице 2.

Таблица 1

Состав экспериментальных и контрольных комбикормов

Компонент	Состав комбикорма	
	контроль	эксперимент
Рыбная мука	66,5	59,9
Пшеничная мука	20,0	18,0
Белково-минеральная добавка	0,0	10,0
Рыбий жир	9,5	8,6
КМЦ	2,0	1,8
Витаминно-минеральный премикс	1,0	0,9
Желатин	1,0	0,9

Таблица 2

Рыбоводные показатели сравнительного выращивания мальков сиговых

Показатели роста	Контрольная группа мальков	Экспериментальная группа мальков
Начальная масса, г	3,47±1,12	3,49±1,12
Конечная масса, г	6,21±2,78	7,04±3,40
Прирост, г	2,74	3,55
Выживаемость, %	92,00±3,10	92,20±1,40
Кормовой коэффициент	2,15±0,5	1,61±0,2
Удельная скорость роста, %	1,03±0,10	1,25±0,25

Из данных таблицы 2 видно, что внесение в комбикорма 10% белково-минеральной добавки вместо идентичного количества рыбной муки, способствует приросту массы мальков лососевых, их выживаемости, удельной скорости роста, а также уменьшению кормового коэффициента.

Проведенные исследования свидетельствуют о высоком аминокислотно-протеиновом и минеральном потенциале добавок, получаемых из шпротных голов методом глубокого термического гидролиза, а также о рациональности их применения в составе комбикормов для лососевых в качестве источника протеинов и минеральных веществ. Целесообразно далее продлить настоящие исследования, повышая дозировку кормовых добавок, получаемых из вторичного шпротного сырья.

На технологию и качество белково-минеральной добавок из шпротных голов разработаны технические документы (ТИ и ТУ), регламентирующие процесс изготовления, качество и безопасность продукции: «Добавка кормовая белково-минеральная на основе гидролизата вторичного шпротного сырья».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Остроумова И.Н. Биологические основы кормления рыб. Изд-е 2-е, испр. и доп. – СПб.: ГосНИОРХ, 2012. – 564 с.
2. Щербина М.А., Гамыгин Е.А. Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – 360 с.
3. Биопотенциал вторичного рыбного сырья/ Мезенова О.Я., Хелинг А., Мерзель Т.// Известия вузов. Пищевая технология, 2018. - № 1. - С. 11-18.
4. Мезенова, О.Я. Биотехнологические способы получения протеиновых и белково-минеральных добавок из вторичного рыбного сырья копильных производств // Известия вузов. Пищевая технология, 2019. - № 2-3. - С. 68-71.
5. Биоактивные белки и пептиды: современное состояние и новые тенденции практического применения в пищевой промышленности и кормопроизводстве / Д.В. Гришин, О.В. Подобед, Ю.А. Гладилина, М.В. Покровская, С.С. Александрова и др. // Вопросы питания. 2017. - Том 86. - №3. - С. 20-31.
6. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones / R. Slizyte, K. Rommi, R. Mozuraityte, P. Eck, K. Five, T. Rustad // Biotechnology Reports. – 2016. –V. 11. - pp. 99-109.ang // Aquaculture Nutrition. – 2012. – Vol. 18 (3). – P. 297-303.
7. Мезенова О.Я. Применение продуктов гидролиза шпротных отходов при кормлении европейского сига *coregonus lavaretus* в аквакультуре / О.Я. Мезенова, Д.С. Пьянов, С.В.Агафонова, Н.Ю. Романенко, В.В. Волков, Н.С. Калинина // Рыбное хозяйство, 2022. - №3. – С. 54-61.

ON THE USE OF INSOLUTION PRODUCTS OF HYDROLYSIS OF SPRAIT WASTE IN COMPOUND FEED FOR SALMON

¹Mezenova Olga Yakovlevna, Doctor of technical Sciences, professor

²Pyanov Dmitry Sergeevich, Ph. of biological Sciences, Researcher

³Agafonova Svetlana Viktorovna, Ph.D. of tech. Sciences, Associate Professor

⁴Romanenko Natalya Yurievna, Ph.D. of tech. Sciences, Associate Professor

⁵Volkov Vladimir Vladimirovich, deputy director of Technopark KSTU

⁶Kalinina Natalya Sergeevna, head of laboratories

^{1,3,4,5,6}Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia,

e-mail: ¹mezenova@klgtu.ru; ³svetlana.agafonova@klgtu.ru; ⁴nataliya.mezenova@klgtu.ru;

⁵vladimir.volkov@klgtu.ru; ⁶natalya.kalinina@klgtu.ru

²VNIRO Atlantic branch of VNIRO (AtlantNIRO), Kaliningrad, Russia,

e-mail: ²pyanov@atlantniro.ru

The problems of modern development of industrial salmon aquaculture in Russia related to forage production are discussed. The use of insoluble sprat waste hydrolysis products as a source of protein and mineral components as a source of protein and mineral components is shown to be promising. Positive results have been obtained in biological tests on rearing whitefish fry using experimental compound feeds. The results of biological tests of rearing whitefish fry with the use of compound feed obtained by adding 10% water-insoluble protein-mineral supplement instead of the same amount of fishmeal are presented.

ГЛУБОКОВОДНЫЕ ВИДЫ РЫБ СЕМЕЙСТВА МАКРУРИД КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ ПРОМЫСЛА И ПЕРЕРАБОТКИ

¹Пивненко Татьяна Николаевна, д-р биол. наук, профессор кафедры «Пищевая биотехнология»

²Позднякова Юлия Михайловна, канд. техн. наук, директор НИИ инновационных биотехнологий

³Есипенко Роман Владимирович, канд. техн. наук, мл. научн. сотрудник

НИИ инновационных биотехнологий

^{1,2,3}Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет
ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз», Владивосток, Россия, e-mail: ¹tnpivnenko@mail.ru

*Проанализированы данные о технологическом потенциале промысловых видов глубоководных рыб семейства макрурид *Macrouridae*: макруруса малоглазого *Albatrossia pectoralis*, макруруса пепельного *Coryphaenoides cinereus* и макруруса черного *Coryphaenoides acrolepis*. Приведены характеристики размерно-массового и химического состава, распределение белковых фракций и активность ферментов в их мышечной ткани. Дано сравнение функционально-технологических свойств. Определены направления рационального использования их в пищевой промышленности.*

Структура промышленного промысла в Тихоокеанском бассейне имеет тенденции к изменению за счет увеличения доли вылова глубоководных видов рыб, среди которых наиболее востребованными являются представители семейства макрурид *Macrouridae*, родственные тресковым *Gadidae*. Макрурусы (долгохвосты или гренадеры) обитают на глубине 300-4000 м от Арктики до Антарктики. Тем не менее, до недавнего времени их не рассматривали в качестве перспективных объектов промысла и их совокупный вылов не превышал 60 тыс. т. Тем не менее, численность и промысловые запасы макрурусов весьма велики. В семействе макрурид насчитывается около 300 видов, при этом большая часть из них не рассматривается в качестве промысловых объектов, т.к. имеет малые размеры при невысокой доле съедобных частей тела и мышечной ткани, которая характеризуется высоким содержанием воды и слабой структурообразующей способностью. Три основных вида рассматриваются в качестве потенциальных объектов для использования в пищевом производстве: макрурус малоглазый *Albatrossia pectoralis*, макрурус пепельный *Coryphaenoides cinereus* и макрурус черный *Coryphaenoides acrolepis*. Биомасса этих видов, обитающих в российских водах северной части Тихого океана оценивается величинами порядка 1,3-2,6 млн т. [1-4].

В северной части Тихого океана наиболее велики запасы макруруса малоглазого или гигантского гренадера. Однако, при переработке этого вида из-за высокой обводненности мышечной ткани наблюдаются существенные технологические потери [3,5]. Макрурус пепельный имеет значительно меньшее промысловое значение. Он распространен в северной части Тихого океана, имеет белое, плотное мясо. Тем не менее, из-за низкого выхода пригодных в пищу частей тела существенного промыслового значения не имеет [3]. На глубинах ниже 1400 м биомасса и численность черного макруруса (черного гренадера) является наиболее высокой. Не смотря на то, что доля его вылова среди остальных промысловых глубоководных видов составляет около 15% [3,4], его потребительские качества обеспечивают разнообразные возможности применения в пищевой промышленности, ресторанной индустрии и домашней кулинарии. [6].

Представленная работа содержит сведения не только по общему химическому составу, но и по изучению биохимических механизмов, влияющих на технологические характеристики и, тем самым, на возможности использования и регулирования их на практике. Это касается состава миофибриллярных белков мышечной ткани, ферментов, влияющих на пищевую ценность и текстуру этой ткани на всех этапах заготовки и переработки. Один из аспектов практического интереса промышленников - возможность отбора (выбраковки) нестандартных образцов на основе выявления биохимических причин данного явления.

Целью работы является изучение факторов, определяющих качество мышечной ткани глубоководных объектов промысла, при их промышленной заготовке и последующей переработке, а

также разработка рекомендаций по совершенствованию технологий получения полуфабрикатов и готовых к употреблению продуктов.

Размерно-массовый состав трех основных видов макрурусов представлен в табл. 1. Наибольший выход продукции, предназначенной для пищевого использования – тушки и филе – отмечен для малоглазого макруруса, затем для черного и пепельного.

Таблица 1

Размерно-массовые характеристики и выход продукции некоторых видов макрурусов

Вид макруруса	Длина, см	Масса, кг	Выход продукции, %	
			Тушка	Филе
Малоглазый	85,2 ± 5,1	1,38 ± 0,23	57,8 ± 3,1	42,1 ± 3,2
Черный	55,2 ± 3,9	0,98 ± 0,17	52,7 ± 2,0	39,1 ± 2,9
Пепельный	39,4 ± 2,8	0,49 ± 0,22	49,5 ± 2,5	35,2 ± 1,9

$n = 7, p < 0,05$

Состав химических компонентов мышечной ткани рассматриваемых видов существенно различается между собой (табл. 2).

Таблица 2

Состав мышечной ткани некоторых видов макрурусов, % от общей массы

Вид макруруса	Вода	Белок	Жир	Минеральные элементы
Малоглазый	91,2 ± 1,9	7,6 ± 1,4	0,3 ± 0,4	1,2 ± 0,4
Черный	83,5 ± 2,1	13,9 ± 1,5	0,4 ± 0,6	1,2 ± 0,3
Пепельный	87,2 ± 1,6	11,5 ± 1,1	0,9 ± 0,7	1,4 ± 0,3

$n = 5, p < 0,05$

Главным образом это связано с содержанием воды, наибольшее количество которой является отличительной характеристикой макруруса малоглазого. Для него же характерно и очень низкое содержание белка. Все виды являются маложирными и практически не различаются между собой по этому показателю.

Для определения фракционного состава белков мышечную ткань подвергали ступенчатой экстракции для разделения водорастворимых (саркоплазматических), солерастворимых (миофибриллярных) и щелочерастворимых (соединительнотканых) белков (табл.3). Показано небольшое количественное преобладание миофибриллярных белков (актин и миозин), определяющих консистенцию мышечной ткани и пищевой продукции из нее. Однако это меньше, чем для большинства промысловых рыб.

Таблица 3

Фракционный состав белков мышечной ткани некоторых видов макрурусов, %

Вид макруруса	Водорастворимые	Солерастворимые	Щелочерастворимые
Малоглазый	33,8 ± 3,3	44,1 ± 2,9	17,7 ± 3,0
Черный	39,7 ± 2,6	42,9 ± 4,7	18,1 ± 1,8
Пепельный	36,5 ± 2,4	42,7 ± 3,1	21,2 ± 2,7

$n = 4, p < 0,05$

Для определения функционально-технологических свойств рыбного сырья были взяты показатели, представленные в таблице 4. Согласно им можно давать рекомендации по рациональным направлениям переработки и получения готовой продукции [7].

Функционально-технологические свойства мышечной ткани некоторых видов макрурусов

Вид макруруса	Показатели					
	Ко	БВК	Кст	Кж	Кб	ВУС, %
Малоглазый	12,2	8,2	0,44	0,05	1,3	29,5
Черный	5,5	17,5	0,46	0,03	1,1	47,5
Пепельный	7,1	14,0	0,43	0,08	1,2	43,9

Условно-белковый коэффициент (Кб) характеризует структурообразующую способность мышечной ткани и представляет собой соотношение содержания миофибриллярных и саркоплазматических белков. По классификации рыбного сырья, описанной в работах [7,8], мышечная ткань рыб по величине этого показателя может быть разделена на три основные группы: I – Кб < 1; II - Кб ~ 1; III - Кб > 1. Хотя этот показатель для всех видов макрурусов немногим выше 1, фарши на их основе имеют слабую формуемость. Это связано с высокими значениями коэффициента обводнения (Ко), определенного по соотношению содержания воды и белка, и белково-водному коэффициенту (БВК), рассчитанному по содержанию белка, приходящегося на 100 г воды. Полученные данные определяют низкую пластическую вязкость фарша, особенно в случае макруруса малоглазого. Коэффициент структурообразования (Кст) характеризует возможность поддержания определенной текстуры продукции, он равен соотношению содержания солерастворимой фракции белков к их общему содержанию. И вновь не смотря на то, что величины этого коэффициента по предложенной классификации (Кст > 0,2) находились в диапазоне значений, определяющих возможность образования коагуляционных структур сочной консистенцией, невысокие значения ВУС определяют такую технологическую особенность мышечной ткани макрурусов как слабую способность к образованию эластичной гелевой структуры. Крайне малое содержание липидов в мышцах макрурусов всех видов определяет низкие показатели липидно-белкового коэффициента (Кж), рассчитанного по соотношению жира и белка. Отдельные исследователи считают важными различия в структуре миотомов, размер которых в мышцах макруруса малоглазого почти втрое больше, чем у минтая и к тому же они менее плотно упакованы [9]. Тем самым более крупные мышечные волокна обеспечивают большее межклеточное пространство для связывания воды и меньшую плотность ткани. При разрушении структуры этой ткани при технологической переработке связанная вода переходит в свободное состояние, что вызывает изменения вязко-эластических свойств продукции.

Таким образом, функционально-технологические характеристик мышечной ткани макрурусов в значительной степени отличаются от известных для других видов рыб, например, для родственных им тресковых [10]. Поэтому при создании формованной продукции из этих рыб необходимо использовать структурообразователи, увеличивающие связывание воды, повышающие вязкость и получение стойкой текстуры.

Ещё одним фактором, способным влиять на изменение реологических свойств мышечной ткани рыб являются ферментные системы. Среди них можно выделить те, которые отвечают за поддержание структурной целостности компонентов мышечной ткани в процессе выполнения физиологических функций, а также играют важную роль на различных этапах добычи и переработки. К ним следует отнести протеолитические ферменты и тканевые транслутаминазы. Активность этих ферментов представлена в табл. 5.

Таблица 5

Ферментативная активность мышечной ткани некоторых видов макрурусов

Вид	Протеазы, Е/г ткани				ТГ, мкмоль//мл
	pH 2,5	pH 4,5	pH 6,0	pH 8,0	
Малоглазый	1,1±0,08	0,90±0,06	0,90±0,04	0,17±0,08	0,032±0,008
Черный	1,4±0,06	0,10±0,02	0,14±0,03	0,09±0,07	0,024±0,009
Пепельный	1,5±0,10	0,15±0,03	0,37±0,03	0,16±0,06	0,014±0,010

$n = 3, p < 0,05$

Протеолитические ферменты в структуре мышечной ткани могут быть связаны с миофибриллами, но, в основном, находятся в лизосомах цитоплазмы и внеклеточного матрикса. При посмертном распаде тканей большинство протеаз переходят в саркоплазму и вызывают тендеризацию мышечной ткани. Синергетическое действие в этом процессе обеспечивают катепсины (рН-оптимум 6,0) и кальпаины (рН-оптимум 7) [11]. Представленные данные демонстрируют низкие величины активности мышечных протеаз трех видов макрурусов в различных диапазонах рН, что не позволяет рассматривать их в качестве причины размягчения мышечной ткани этих видов рыб.

Как считает ряд исследователей, адаптация к условиям обитания на больших глубинах привела к повышенному содержанию такого тканевого фермента как трансглутаминаза (ТГ), воздействующего на миофибриллярные белки, в основном, на миозин. При воздействии ТГ образуются межбелковые мостики, обеспечивающие полимеризацию молекул и формирование прочных и эластичных гелей. Величины активности ТГ варьируются в достаточно широких пределах и зависят от видовой принадлежности, физиологического состояния, среды обитания и других факторов. Большая изменчивость каталитической активности ТГ отмечена на различных этапах рыбопереработки. Ранее было отмечено, что среди целого ряда глубоководных рыб макрурус малоглазый содержит наиболее активную ТГ [11,12]. Нами также были подтверждены эти данные, полученные при использовании метода определения количества ϵ -аминогрупп лизина в молекулах казеина, подвергнутых действию ТГ [13]. Однако существенных различий между видами макрурусов не выявлено. Известно также, что для ощутимого становления гелевой структуры мышечной ткани должно соблюдаться определенное фермент-субстратное соотношение. Достигнуть такого соотношения возможно при увеличении концентрации миозина в процессе технологических операций или при добавлении иных белковых субстратов.

Таким образом, химический состав и технологические свойства макрурусов существенно отличаются от большинства известных промысловых видов, а также между собой. Поэтому для разработки способов получения пищевой продукции из разных видов макрурусов потребуются различные подходы.

В дальнейшем при обосновании направлений переработки мы рассматривали только малоглазого и черного макрурусов, как наиболее промышленяемых и востребуемых.

В таблице 6 представлены некоторые реологические характеристики мышечной ткани этих двух видов до и после термообработки, при которой равные кусочки филе нагревали при температуре 100 ± 2 °С в течение $2,0 \pm 0,5$ мин. При этом мышечная ткань сохраняла свою целостность, приобретая кулинарную готовность.

Таблица 6

Свойства мышечной ткани макрурусов до и после термообработки

Вид	Прочность мышечной ткани, Н		Вязкость фарша, Па·с	Степень денатурации белков, %	Потери при термообработке, %
	Сырец	После варки			
Малоглазый	$0,23 \pm 0,16$	$0,26 \pm 0,15$	$17,5 \pm 2,4$	$65,1 \pm 4,3$	$57,2 \pm 6,8$
Черный	$1,60 \pm 0,14$	$1,10 \pm 0,16$	$129 \pm 8,6$	$69,8 \pm 4,0$	$22,3 \pm 6,4$

$n = 4, p < 0,05$

Для сырого и отваренного образцов малоглазого макруруса величины прочностей крайне низки и не могут быть оценены как достоверные. При измельчении полученный фарш характеризовался очень низкой вязкостью, а потери при термообработке приближались к 60 %.

При разработке пищевых продуктов из мышечной ткани малоглазого макруруса нами были предложены способы, позволяющие минимизировать потери и обеспечить формирование текстуры, удовлетворяющей требованиям к формованной рыбной продукции. Для этого были использованы белки, обладающие структурообразующими свойствами, такие как казеин и желатин в сочетании с препаратом ТГ АСТИВА (Аджиномото Ко., Япония). Также эти белки соответствуют субстратной специфичности фермента. При добавлении 5 % белковых субстратов, и 1% ТГ к массе сырья была получена плотная, однородная и упругая консистенция при увеличении всех исследуемых показателей, включая влагоудерживающую способность при снижении потерь при термообработке. На формованные продукты из макруруса малоглазого разработана нормативная документация.

Полученные для макруруса черного данные о реологических свойствах его мышечной ткани и примеры использования его в блюдах дальневосточной кухни (<https:// pacificrussiafood.ru/>) позволяют рекомендовать для его приготовления различные способы при кратковременной термообработке. Однако на предприятиях общественного питания были отмечены отдельные экземпляры с жесткой резиновой консистенцией мяса, усиливающейся после приготовления. На образование резиновой консистенции ряда видов рыб могут влиять такие факторы как замораживание рыбы в стадии неразрешенного посмертного окоченения, длительное морозильное хранение, неоднократное замораживание и размораживание [14]. При сравнении стандартных и резиновых образцов были показаны существенные различия не только органолептических, но и физико-химических показателей. Для резиновой мышечной ткани были характерны темно-серый цвет и очень плотная структура. После термообработки мышечная ткань приобретала еще большую плотность и с трудом отделялась от костей. Прочность стандартных образцов до термообработки достигала 1,6, а после – 1,2 Н, в то же время образцы с резиновой консистенцией показали существенно более высокие величины: до термообработки – 2,3 Н, после – 5,3 Н. Наиболее отличительными характеристиками были: значительное снижение содержания миофибриллярных белков (до 17 % от общего количества) при очень высокой степени их денатурации (до 97 %). Исследование молекулярно-массового состава белковых фракций показало существенные различия в составе специфических водорастворимых белков и снижении доли миофибриллярных (рис.1).

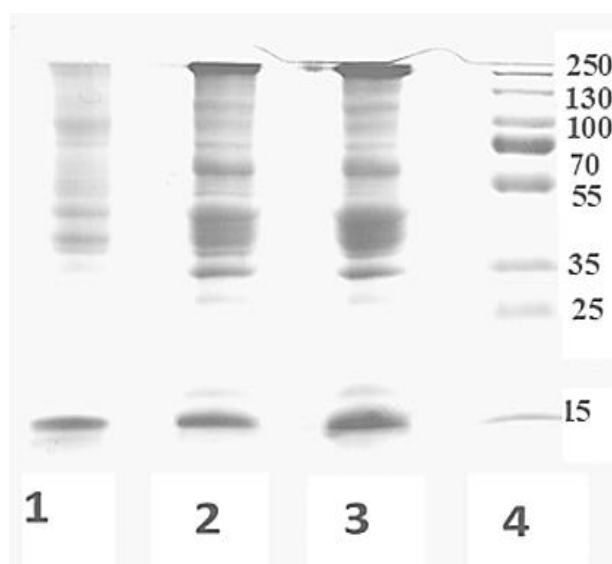


Рис. 1. Разделение белковых фракций мышечной ткани черного макруруса методом электрофореза в полиакриламидном геле (ЭФ-ПААГ): 1 – резиновый образец; 2 – крупноразмерный экземпляр; 3 – мелкоразмерный экземпляр; 4 – маркерные белки с известной молекулярной массой (кДа).

Условия ЭФ: 10 %-ный ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия, напряжение 220 В, ток 10 мА, мощность 2,5 Вт.

Полученные результаты показывают, что образование не характерной для большинства экземпляров резиновой консистенции мышечной ткани черного макруруса может быть связано со сложными агрегационными изменениями миофибриллярных белков, их денатурацией, снижением растворимости и изменениями молекулярно-массового распределения. Подобные процессы могут происходить при замораживании рыбы на стадии неразрешенного посмертного окоченения в состоянии асфиксии в условиях промысла. Возникающие изменения являются факторами, ответственными за органолептические и реологические свойства сырца и готовой продукции. Рекомендуемый способ отбора качественного сырья – индивидуальный осмотр и отбраковка нестандартных экземпляров.

Таким образом, промышленный промысел глубоководных видов рыб семейства макруриды *Macrouridae* обеспечен высокими запасами, потребительские качества позволяют отнести их к ценному диетическому виду сырья. Выявленные особенности химического состава, включая фракционный состав белков, их молекулярно-массовое распределение, активность тканевых ферментов, позволяют определить рекомендации по их пищевому использованию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов А.М. Симпозиум «Макрурусы Мирового океана: биология, оценка запасов и промысел». – Рыбное хозяйство. – 2007. – № 4. – С. 55-57.
2. Токранов А.М., Орлов А.М., Шейко Б.А. Промысловые рыбы материкового склона прикамчатских вод. – Петропавловск-Камчатский: Изд-во «Камчатпресс», 2005. 52 с.
3. Turonogov V., Novikov N.P. Grenadier as an important reserve of Far Eastern deep-sea fisheries. – Fisheries. – 2016. – № 6. – P. 54-60.
4. Кодолов Л.С. Некоторые данные по биологии чёрного макруруса *Coryphaenoides acrolepis*. – Известия ТИНРО. – 2003. – Т.134. – С. 144-151.
5. Pivnenko T.N., Karpenko Yu.V., Krashchenko V.V., Pozdnyakova Yu.M., Esipenko R.V. Biochemical factors affecting the quality of products and the technology of processing deep-sea fish, the Giant Grenadier *Albatrossia pectoralis* // Journal of Ocean University of China. – 2020. –V.19. – P. 681–690.
6. Пивненко Т.Н., Позднякова Ю.М., Кращенко В.В., Есипенко Р.М., Михеев Е.В. Исследование качества мышечной ткани черного макруруса (гренадера) в процессе его переработки. – Рыбное хозяйство. – 2022. – № 3. – С. 93-100.
7. Арнаутов. М.В., Артемов Р.В., Бурлаченко И.В. и др. Исследование пищевой ценности и функционально-технологических свойств гибрида бестера с русским осетром. – Труды ВНИРО Технология переработки водных биоресурсов. – 2018. – Т. 171. – С. 170-179.
8. Цибизова М.Е. Систематизационный подход к показателям качества мелких рыб и вторичных рыбных ресурсов. – Известия вузов. Пищевая технология. – 2014. – № 1 (337). – С. 9-13.
9. Срапо С., Himelbloom B., Pfitzenreuter R. Causes for soft flesh in giant grenadier (*Albatrossia pectoralis*) fillets. – J.Aquat. Food Prod. Technol. – 1999. – V.8 (3) – P. 55-68.
10. Справочник по химическому составу и технологическим свойствам морских и океанических рыб. – М.: Изд-во ВНИРО, 1998. 224 с.
11. Tolano-Villaverde I.J., Torres-Arreola W., Ocaño-Higuera V.M., Marquez-Rios E. Thermal gelation of myofibrillar proteins from aquatic organisms. – CyTA Journal of Food. – 2016. – V. 14(3). – P. 502-508.
12. Karaulova E.P., Yakush E.V. The comparative study of myofibrillar proteins of skeletal muscle of some deep-sea fish species. – Journal of Fisheries Sciences. – 2017. – V.11(2). – P. 1-8.
13. Dinnella C., Gargaro M.T., Rossano R., Monteleone E. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. – Food Chem. – 2002. – V. 78(3). – P. 363–368.
14. Ахмедова Т.П. Снижение качества рыбного сырья при повторном замораживании. Научные записки ОрелГИЭТ. – 2012. – №2(6). – С. 392-395.

DEEP - SEA FISH SPECIES OF THE MACRURID FAMILY AS PROMISING OBJECTS OF FISHING AND PROCESSING

¹Pivnenko Tatiana Nikolaevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of "Food Biotechnology"

²Pozdnyakova Yulia Mikhailovna, Ph.D., Director of the Research Institute of Innovative Biotechnologies

³Esipenko Roman Vladimirovich, Ph.D., M.Sc., Research Institute of Innovative Biotechnologies

^{1,2,3}Far Eastern State Technical Fisheries University "Dalrybtuz", Vladivostok, Russia, e-mail: ¹tnpivnenko@mail.ru

*The paper analyzed data on the technological potential of commercial species of deep-sea fish of the macrurid family (Macrouridae): giant grenadier *Albatrossia pectoralis*, popeye grenadier *Coryphaenoides cinereus* and black grenadier *Coryphaenoides acrolepis*. The characteristics of the size-mass and chemical composition, the distribution of protein fractions and the activity of enzymes in their muscle tissue were given. A comparison of functional and technological properties was presented. The directions of rational use in the food industry of these species were determined.*

ВЫДЕЛЕНИЕ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ХИТИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА

¹Рысакова Кира Сергеевна, канд. биол. наук, научный сотрудник

²Новиков Виталий Юрьевич, канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник

³Шумская Надежда Владимировна, специалист

Полярный филиал ВНИРО (ПИНРО им. Н. М. Книповича),
Мурманск, Россия, e-mail: ¹rysakova@pinro.ru

*Изучены способы выделения и фракционирования хитинолитических ферментов из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* с целью выбора операций для реализации промышленной технологии получения ферментного препарата. Методами осадительного сепарирования гепатопанкреаса с последующей ультрафильтрацией и аффинной адсорбцией проведено концентрирование белковых фракций, содержащих хитинолитические ферменты. Обогащение после ультрафильтрации составило 864 раза. Изучены некоторые физико-химические свойства хитинолитических ферментов. Результаты работы показали возможность получения ферментного препарата с хитинолитической активностью из гепатопанкреаса краба.*

1. Введение

Получение ферментных препаратов специфического действия является одним из важных направлений развития современной биотехнологии. В качестве сырья наибольший интерес представляют отходы промышленной переработки морских гидробионтов, которые могут достигать 60 % от массы улова и поиск путей их рационального использования в настоящее время весьма актуален. Одним из таких потенциальных источников ферментов разной субстратной специфичности [1] в последние годы стал гепатопанкреас краба, масса которого составляет до 8 % массы тела животного [2]. Это связано с развитием береговой переработки краба, когда неиспользуемые отходы, включающие панцирь и внутренние органы, не могут быть сброшены в океан, а должны быть утилизированы на берегу.

Известны различные способы выделения и очистки ферментов из гепатопанкреаса камчатского краба, которые ориентированы в первую очередь на получение протеолитических ферментов с коллагенолитической активностью: полное обезжиривание гепатопанкреаса и получение так называемого ацетонового порошка [3], осаждение сульфатом аммония [4], хроматографическое разделение белков [5], разделение фракций методом ультрафильтрации [6].

Помимо протеолитических ферментов с коллагенолитической активностью, в гепатопанкреасе камчатского краба обнаружены хитинолитические [7], липолитические ферменты [8], а также гиалуронидаза [9], эластаза [10] и другие гидролитические ферменты.

Хитинолитические ферменты представляют особый интерес для промышленной модификации хитина и хитозана и позволяют оценить возможность более рентабельного использования внутренних органов промысловых беспозвоночных в качестве сырья для их получения. [11].

Хитинолитические ферменты выделяют преимущественно из культуральной жидкости микроорганизмов (бактерий и грибов), растущих на хитинсодержащих средах [12].

Мы предприняли некоторые шаги в области изучения и упрощения способов выделения хитинолитических ферментов из гепатопанкреаса краба. Решения требуют две проблемы: получение обезжиренного концентрата водорастворимых белков из гепатопанкреаса и фракционирования белков по их субстратной специфической активности.

При получении ферментного препарата (ФП) из гепатопанкреаса камчатского краба удаление липидов – одна из самых необходимых и затратных стадий обработки.

Наиболее простым способом можно считать получение ацетонового порошка при достаточной экстракции липидов органическими растворителями при низкой температуре. В этих условиях

обеспечивается практически полная обратимая денатурация ферментов с сохранением ферментативной активности.

Возможна замена экстракции липидов из водной суспензии гепатопанкреаса адсорбцией или соосаждением с коагулянтами, например, хитозаном [13]. Но в этом случае не достигается полное извлечение липидов и возможно загрязнение ФП применяющимися реагентами.

Сепарирование гепатопанкреаса на липидную и водную фазы достаточно технологично. Но, как показывает практика использования промышленных сепараторов, полное извлечение липидов из водных фракций не достигается. В этом случае, при дополнительной экстракции, количество расходуемых растворителей снижается по сравнению с обезжириванием всего исходного гепатопанкреаса.

Решение второй проблемы, фракционирование ферментов по субстратной специфичности, обусловлено тем, что при получении ФП из отходов переработки гидробионтов получают обычно препараты, содержащие смесь ферментов. Выделение отдельных ферментов связано со значительными затратами и многостадийными процессами, включающими высаливание фракций белков, хроматографию и электрофорез белков. Для разделения комплексных ФП на отдельные ферменты используются различные методы [14]: мембранные (диализ и электродиализ, баромембранные методы (обратный осмос, ультрафильтрация, микрофильтрация и тонкая фильтрация), осаждение ферментов органическими растворителями, высококонцентрированными растворами солей (высаливание), методы избирательной денатурации (термическая, рН, и др.), адсорбции (ионообменная, аффинная хроматография, иммуноадсорбция, гель-хроматография и др. Большинство этих методов позволяет разделять ферменты по молекулярной массе, ионному заряду, растворимости и др. физико-химическим способам, что не позволяет проводить четкое выделение ферментов с определенной субстратной специфичностью. Наиболее перспективным является аффинное связывание ферментов со специфическим субстратом [15].

При фракционировании ФП гепатопанкреаса камчатского краба в первую очередь требуется разделить протеолитические и хитинолитические ферменты, которые могут иметь большое значение для медицины, экологии, пищевой промышленности, путем отделения хитинолитических ферментов с использованием аффинного связывания с хитином или хитозаном.

Аффинная хроматография на хитине была показана как перспективный подход для выделения и очистки хитиназ. Хитиназы из различных микробных источников очищали до почти гомогенного состояния с помощью аффинной хроматографии на хитине, коллоидном хитине или хитозане [16]. Также использовали метод аффинной хроматографии на колонке, заполненной хитином [17]. ФП растворяли в буфере (рН 8,4) и наносили на колонку с регенерированным хитином. Связанную с хитином хитиназу вымывали ацетатным буфером с градиентом рН от 5,4 до 3,2, и окончательно уксусной кислотой рН 3,2. В работе [18] хитиназы сорбировали на аффинной колонке с набухшим хитином краба и затем элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 1 моль/дм³. Существует также и ряд других методов аффинного связывания [19; 20; 21; 22].

Целью данного исследования являлось изучение способов выделения и концентрирования хитинолитических ферментов из гепатопанкреаса Камчатского краба.

2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись гепатопанкреас камчатского краба и ферментные препараты (ФП), полученные из него. Гепатопанкреас камчатского краба был предоставлен компанией ООО «Антей».

Для адсорбции хитинолитических ферментов использовали нативный и регенерированный хитин, полученный из хитозана.

Хитин и хитозан получали из панциря краба по известным методикам [23].

Нативный хитин (СД = 19,0 %) измельчали и просеивали через сито с размером отверстий 150 меш (0,1 мм).

Регенерированный хитин получали из хитозана по модифицированной методике [24]. 10 г хитозана (СД = 86 %) смешивали с 10 %-ным раствором уксусной кислоты (20 см³ ледяной уксусной кислоты + 200 см³ воды). Полученную смесь оставляли на ночь при комнатной температуре до полного растворения хитозана. К раствору хитозана при перемешивании добавляли 900 см³ этанола. Мутный

раствор фильтровали через фильтр Шотта ПОР 160. Для ацетилирования в полученный раствор при постоянном перемешивании добавляли 15 см³ уксусного ангидрида. Образовавшийся гель оставляли на ночь. Выделившийся раствор свивали, гель заливали этанолом и гомогенизировали в течение 5 минут. Полученный мелкодисперсный хитин фильтровали на фильтре Шотта ПОР 160, промывали водой до нейтрального значения рН (не менее 6,5). После фильтрования массовая доля сухого хитина составляла 6,4 %. Хитин имел СД = 7,9 %.

Ферментный препарат ФП₀ - ацетоновый порошок, получали по известной методике [25] из гепатопанкреаса краба последовательной обработкой его охлажденными до минус 20 °С ацетоном, н-бутанолом и повторно ацетоном. Осадок сушили в вакуумном шкафу при (15±5) °С в течение 3-4 ч, затем лиофилизировали в течение 20 ч в сушилке Heto FD 8 («Heto-holten A/s», Дания).

Фракционирование гепатопанкреаса центрифугированием. Гепатопанкреас краба был смешан с водой при соотношении массы сырья и воды 1:2 при температуре не выше 6 °С. Смесь центрифугировали в пробирках на центрифуге Avanti JA-25 («Beckman», Швейцария) при температуре (4±1) °С в течение 120 мин при факторе разделения 7500·g (7500 мин⁻¹), соответствующем промышленным сепараторам и максимальном для применяемой центрифуги – 75600·g (25000 мин⁻¹). Для исследований отбирали водную фракцию, содержащую водорастворимые белки.

Предварительное фракционирование далее проводили двумя способами: 1) часть раствора белков лиофилизировали, высушенный препарат промывали 8 кратным объемом ацетона и 2-х кратным объемом бутанола, сушили, как при получении ФП₀, и получали ферментный препарат ФП₁; 2) из второй части раствора белки осаждали ацетоном при соотношении объемов раствора и ацетона 1:2, осадок отделяли центрифугированием, затем опять промывали той же системой растворителей, сушили и получали препарат ФП₂ (аналогично [26]).

Фракционирование ферментного препарата ультрафильтрацией. Для фракционирования готовили суспензию 1 % ФП₀ в растворе 0,15 моль/дм³ NaCl при (4 ± 1) °С. Нерастворимый осадок отделяли в течение 30 мин на центрифуге Avanti JA-25 («Beckman», Швейцария) при (4 ± 1) °С, фактор разделения 17696·g (10000 об/мин).

Растворенные белки фракционировали на ультрафильтрационной полуволоконной установке УП-1 (НПП «Биоспектр», СССР) в холодильной камере при температуре 6±2 °С.

Использовали сменные ультрафильтрационные модули AP-0,1 (НПК «Биотест», Россия), имеющие следующие молекулярно-массовые пределы задержания (ММПЗ): 5, 10, 20, 50, 100 и 300 кДа.

Каждую фракцию на мембране промывали раствором 0,15 моль/дм³ NaCl при 6±2 °С. Полученный раствор обессоливали и промывали дистиллированной водой на мембране 5 кДа при той же температуре. Было получено 6 фракций 5-10, 10-20, 20-50, 50-100, 100-300 и более 300 кДа.

Адсорбция на измельченном хитине. 1 г препарата ФП₁ растворяли в 99 см³ воды при температуре не выше 6 °С. Затем к 40 см³ раствора ФП₁ добавляли при перемешивании 2 г хитина и выдерживали в холодильнике при периодическом перемешивании в течение 1 ч. Параллельно в холодильнике выдерживали 40 см³ ФП₁ без добавления хитина.

Адсорбция на регенерированном хитине. 0,5 г препарата ФП₁ растворяли в 12,13 см³ воды при температуре не выше 6 °С и добавляли 39,87 см³ регенерированного хитина с массовой долей хитина 6,27 %. Для контроля 0,5 г препарата ФП₁ растворяли в 49,5 см³ воды. Обе смеси выдерживали в холодильнике при периодическом перемешивании в течение 1 ч.

После адсорбции суспензии центрифугировали и в супернатанте определяли активности ферментов.

Осадок измельченного хитина после центрифугирования обрабатывали 1 моль·дм⁻³ раствором NaCl, выдерживали 30 мин в холодильнике, центрифугировали и в фугате определяли активность ферментов.

Физико-химические свойства хитинолитических ферментов изучали на препарате ФП₂.

Протеолитическую активность (A_{prot}) определяли спектрофотометрически по поглощению растворимых пептидов на 280 нм по модифицированному методу Ансона [27].

Экзохитиназную активность (A_{exo}) определяли по реакции продукта гидролиза N-ацетилглюкозамина с 4-диметиламинобензальдегидом с образованием окрашенного комплекса. [28]. За 1 единицу экзохитиназной активности принимали количество мкмоль Nацетилглюкозамина, образующееся при действии 1 г фермента на коллоидный хитин за 1 минуту.

Эндохитиназную активность (A_{endo}) измеряли в процентах уменьшения оптической плотности суспензии коллоидного хитина после инкубации при 37°C в течение 30 мин при 700 нм [29].

Молекулярно-массовое распределение белков определяли методом эксклюзионной ВЭЖХ на жидкостном хроматографе LC-10A_{VP} («Shimadzu», Япония) с использованием колонки TSK-gel Alpha-4000 (30 × 0,78 см) («TOSOH», Япония). В качестве элюента использовали 0,15 моль/дм³ раствор NaCl, pH 7, скорость элюента 0,8 см³/мин. Фракции белков регистрировали по оптическому поглощению с помощью детектора SPD-10A_{VP} на длине волны 280 нм. Для калибровки использовали набор белков с известной молекулярной массой (ММ) и отдельные аминокислоты фирмы «Sigma» (США).

Массовую долю воды и жира определяли стандартными методами по ГОСТ 7636-85 [30].

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Выделение ферментного препарата из гепатопанкреаса краба

Была изучена возможность получения ФП с использованием центрифугирования для быстрого отделения липидов из гепатопанкреаса (Таблица 1).

Таблица 1

Содержание влаги и жира в осадке и водной фракции гепатопанкреаса камчатского краба

Фактор разделения, g	Жировая фракция		Водная фракция		Осадок	
	7500	75600	7500	75600	7500	75600
Масса, г	33,71	17,70	17,95	8,30	5,68	2,70
Вода, %	-	-	8,88	10,70	6,10	4,07
Жир, %	-	-	1,66	1,32	29,60	41,00
Жир, % от общего жира	90,11*	87,84*	1,49	1,09	8,40	11,07

*В жировой фракции массовую долю жира рассчитывали по материальному балансу вычитанием массы жира в водной фракции и осадке из массы жира в исходном гепатопанкреасе.

При среднем факторе (7500 g) разделения в жировую фракцию перешло около 90 % жира, в осадок – около 8 %. В растворе, содержащем водорастворимые белки, обнаружено около 1,5 % жира. При увеличении фактора разделения в 10 раз массовая доля жира в осадке увеличивается до 11 %, а в растворе незначительно снижается до 1 %. Сепарирование, как и ожидалось, не привело к полному обезжириванию белковой части, и потребовалось дополнительное обезжиривание растворителями. Из водной фракции после центрифугирования были получены два препарата – ФП1 и ФП2. Протеолитическая и экзохитинолитическая активность этих препаратов по сравнению с ацетоновым порошком приведены в таблице 2.

Осаждение водорастворимых ферментов ацетоном приводит к заметному обогащению ФП протеолитическими и хитинолитическими ферментами. Хитинолитическая активность ферментов в ФП₂ увеличилась в 54 раза, по сравнению с ацетоновым порошком из гепатопанкреаса краба. Этот способ, по-видимому, может быть совмещен в единой технологической цепочке с сепарированием гепатопанкреаса при отделении липидной фракции и нерастворимых веществ.

Таблица 2

Протеолитическая (A_{prot}) и экзохитинолитическая (A_{exo}) активность ФП из гепатопанкреаса, выделенных разными способами

Ферментная активность	ФП – исходный ацетоновый порошок (ФП ₀)	ФП после высушивания водного раствора (ФП ₁)	ФП после осаждения ацетоном (ФП ₂)
A_{prot} , мкмоль Туг · г ⁻¹ · мин ⁻¹	144,0	252,1	882,9
A_{exo} , мкмоль ГлсНАс · г ⁻¹ · мин ⁻¹	0,023	0,425	1,239

3.2. Фракционирования методом ультрафильтрации

Фракционирование образца ФП₀ проводили последовательно на мембранах с различным диапазоном разделения по молекулярным массам и каждой фракции определяли молекулярно-массовое распределение белков с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии и активности ферментов.

Молекулярно-массовое распределение фракций показано на рисунке 1. Половолоконные мембраны не дают четкого разделения по молекулярным массам, поэтому белки с одинаковыми молекулярными массами обнаруживаются в разных фракциях. Тем не менее данный метод позволяет концентрировать в отдельных фракциях белки с заданными молекулярными массами и его можно считать одной из начальных стадий на пути к более тонкому фракционированию (хроматография, дробное высаливание и др.).

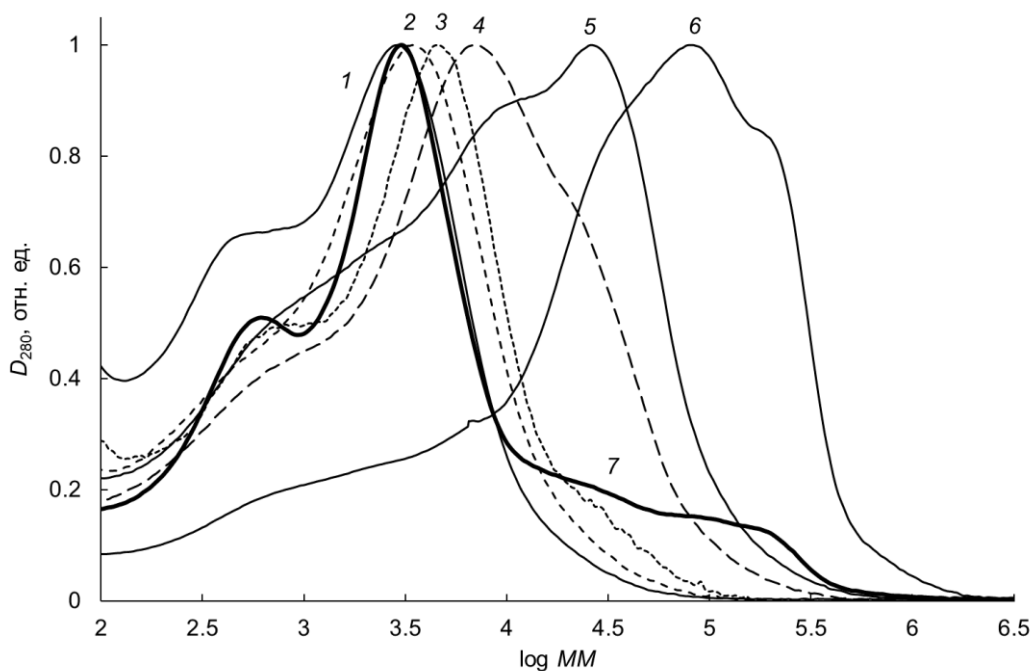


Рис. 1. Хроматограммы фракций белков после ультрафильтрации ФП₀.
1 — фракция 5-10 кДа, 2 — 10-20 кДа, 3 — 20-50 кДа, 4 — 50-100 кДа, 5 — 100-300 кДа,
6 — более 300 кДа, 7 — исходный ФП;

Экзохитинолитические ферменты были сосредоточены в двух фракциях 20-50 и 100-300 кДа, что подтверждает известные из научной литературы сведения о существовании димеров хитиназ с молекулярной массой более 100 кДа (Рисунок 2). Максимальная хитинолитическая активность наблюдалась во фракции 100-300 кДа и была в 16 раз выше, чем в ФП₀.

Эндохитинолитическая активность была обнаружена в диапазоне молекулярных масс 5-20, 50-100 и 100-300 кДа. Максимум активности также был отмечен в последней фракции.

Протеолитическая активность в основном была сосредоточена во фракции с ММ 20-50 кДа.

Полученные результаты показали, что белки с экзо- и эндохитинолитической активностью можно сконцентрировать между мембранами с ММПЗ 100 и 300 кДа. Доля протеолитических ферментов составит в этой фракции около 10 %.

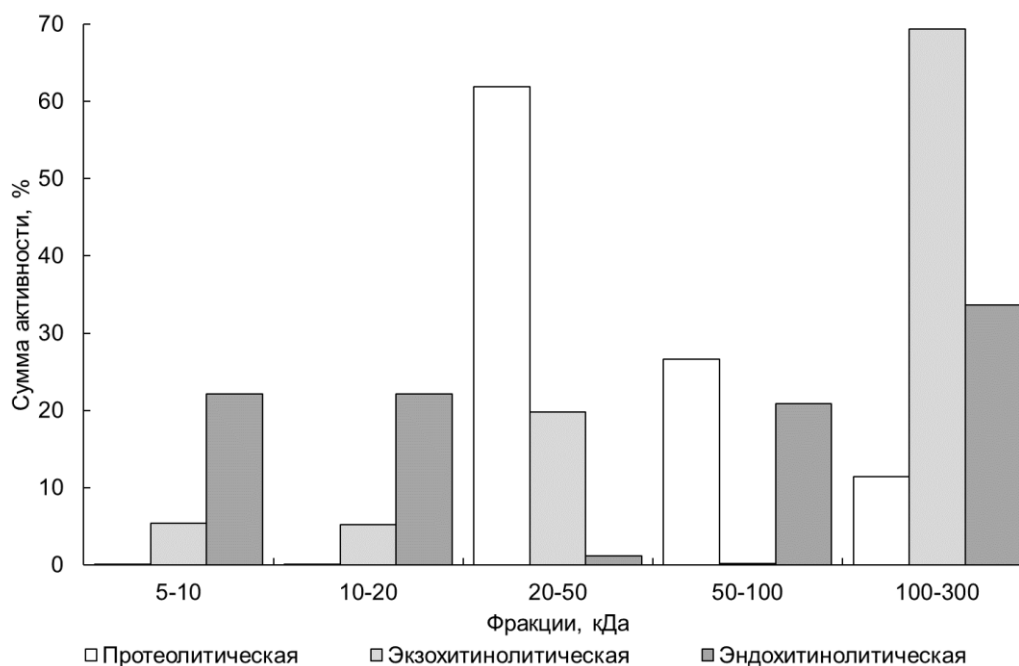


Рис. 2. Распределения протеолитической, экзо- и эндохитинолитической активности по фракциям белков после ультрафильтрации ФП. (Сумма активности – это доля протеолитической, эндо- и экзохитиназных активностей в процентах в каждой белковой фракции от суммы каждого вида активности во всех фракциях).

3.3. Аффинная адсорбция хитинолитических ферментов на хитине

Аффинное связывание хитинолитических ферментов хитином проводили с использованием образца ФП₁ на обычном измельченном хитине из панциря краба и на регенерированном хитине, полученном из хитозана.

Таблица 3

Активность ФП₁ после аффинного связывания на хитине

№ п/п	Активность	ФП ₁	ФП ₁ +хитин	% связывания
	Измельченный хитин			
	A_{prot} , мкмоль ТуГ/г	1113,0	790,4	29,0
	A_{exo} , мкмоль GlcNAc·г ⁻¹ ·мин ⁻¹	0,571	0,129	77,4
	A_{endo} , %	14,75	2,6	82,4
	Регенерированный хитин			
	A_{prot} , мкмоль ТуГ/г	1113,0	579,9	47,9
	A_{exo} , мкмоль GlcNAc·г ⁻¹ ·мин ⁻¹	0,571	0,099	82,7
	A_{endo} , %	14,75	3,17	78,6

Из данных, приведенных в таблице 3, видно, что на хитине наблюдается адсорбция не только хитинолитических, но и протеолитических ферментов. При этом эффективность адсорбции хитинолитических ферментов в 2-2,5 раза выше, что согласуется с существованием эффекта аффинного связывания хитинолитических ферментов с субстратом.

Снижение протеолитической активности в исходном растворе может иметь несколько возможных объяснений. Первое заключается в возможности адсорбции протеолитических ферментов на хитине. Второе – существование ферментов со смешанными активными центрами – протеолитическими и хитинолитическими. При аффинном связывании хитинолитических ферментов с хитином происходит также связывание и части протеолитической активности.

Из данных таблицы 3 следует, что регенерированный хитин проявляет большую адсорбционную способность по отношению к хитинолитическим ферментам, чем измельченный хитин. Но различие в доле связывания небольшая (82,7 % против 77,4 %). Работа с регенерированным хитином отличается большей трудозатратностью и для практического применения наиболее пригодным можно считать измельченный хитин.

По данным ВЭЖХ фракция, которая была элюирована с хитина и проявляла хитинолитическую активность, имеет молекулярную массу в диапазоне от 45 до 245 кДа (Рисунок 3).

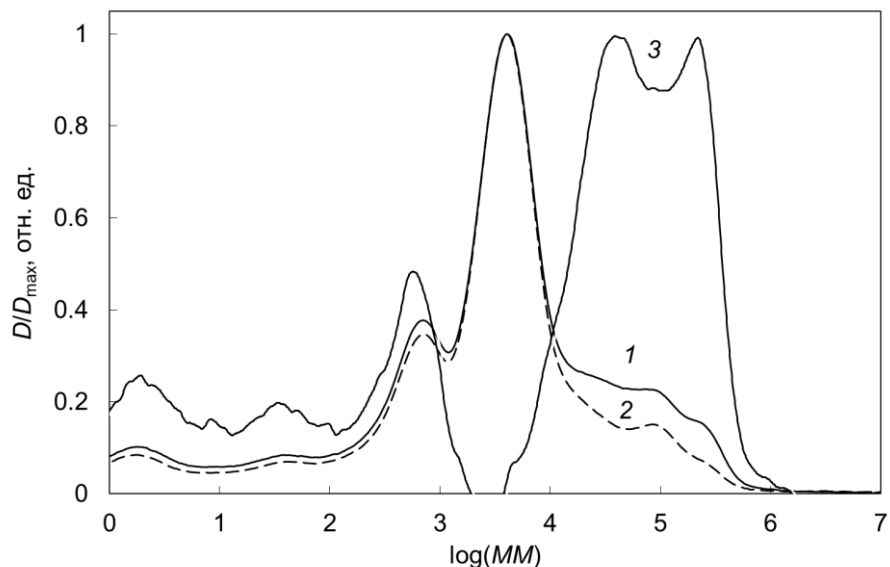


Рис. 3. Молекулярно-массовое распределение белков в исходном ФП₁, в ФП, оставшемся в растворе после аффинной адсорбции на регенерированном хитине, (2) и препарате, элюированном с регенерированного хитина (3).

Это совпадает с результатами, полученными ранее при фракционировании ферментного препарата (ацетонового порошка) методом ультрафильтрации, а именно, максимальная хитинолитическая активность наблюдалась во фракции, собранной между мембранами с молекулярно-массовыми пределами задержания 100 и 300 кДа.

3.4. Свойства хитинолитических ферментов

Свойства хитинолитических ферментов изучали на ферментном препарате ФП₂, полученном при осаждении белков из водного раствора с помощью ацетона и имеющем более высокую хитинолитическую активность по сравнению с ФП₁.

Изучены зависимости экзо- и эндохитинолитической активности от pH и температуры инкубационной среды.

Экзохитиназная активность определялась непосредственно в 1 % растворе ферментного препарата. Для определения эндохитиназной активности раствор ферментного препарата был разбавлен в 50 раз, так как при концентрации ФП₂, равной 1 %, наблюдалось полное обесцвечивание суспензии хитина.

На зависимости экзохитиназной активности от pH обнаружены два максимума, соответствующие pH около 4,5 и 8,5 (Рисунок 4, кривая 1). Первый максимум для эндохитиназной активности оказался смещён к pH 5,0-5,5, а второй максимум практически совпал с максимумом экзохитиназной активности (Рисунок 4, кривая 2).

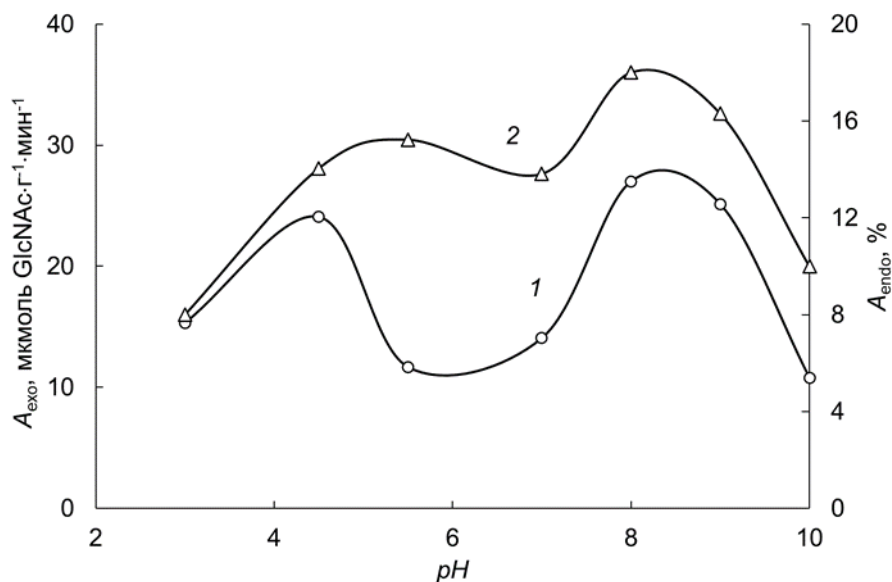


Рис. 4. Зависимость экзо- (1) и эндохитиназной активности (2) хитинолитических ферментов от pH при температуре инкубации 37 °C.

Зависимости экзо- и эндохитиназной активностей от температуры показали существование одного максимума, лежащего около 35 °C (Рисунок 5).

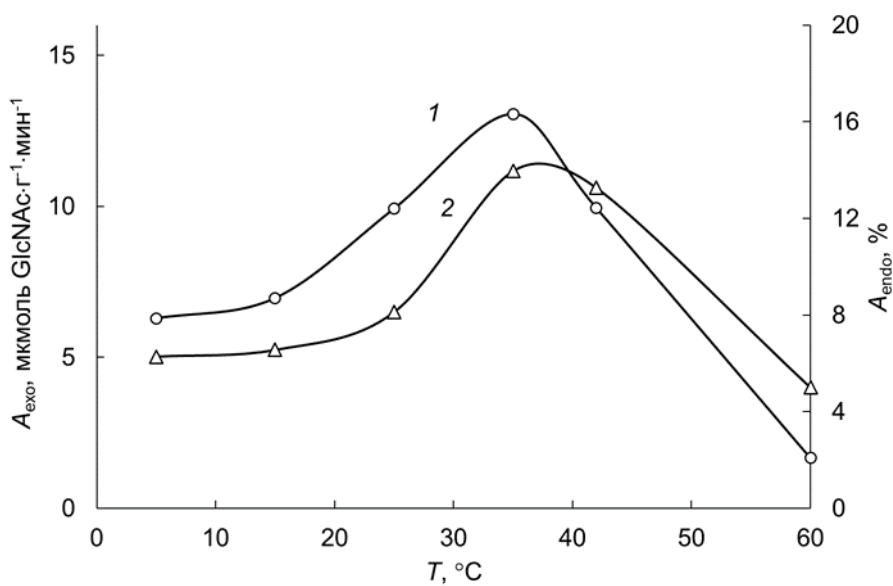


Рис. 5. Зависимость экзо- (1) и эндохитиназной (2) активности хитинолитических ферментов от температуры инкубации при pH 6,5.

Полученные результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными данными [7, 11].

Заключение

В статье рассмотрены способы возможного выделения хитинолитических ферментов гепатопанкреаса камчатского краба, которые могут быть использованы в промышленном производстве ферментных препаратов. Показано, что отдельные стадии фракционирования позволяют последовательно повысить содержание хитинолитических ферментов в ферментном препарате. На основании обсуждения полученных результатов нами предложена следующая схема промышленного выделения хитинолитических ферментных препаратов из гепатопанкреаса краба: 1) сепарирование

суспензии гепатопанкреаса для отделения водорастворимых белков от нерастворимых тканей и липидов; 2) осаждение водорастворимых белков ацетоном; 3) ультрафильтрация на мембранах 100 и 300 кДа; 4) аффинное связывание на хитине. По приблизительной оценке, первые две стадии позволяют обеспечить повысить хитинолитическую активность ферментного препарата приблизительно в 54 раза по отношению к ацетоновому порошку ФП₀, третья – до 864. Последняя стадия очистки на хитиновом сорбенте требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prospects of red king crab hepatopancreas processing: fundamental and applied biochemistry / Т. Ponomareva, М. Timchenko, М. Filippov et al. // *Recycling*. - 2021. - V. 6, N 1. - Art. ID: 3. <https://doi.org/10.3390/recycling6010003>.
2. Химический состав и биохимические свойства камчатского краба в Баренцевом море / В. А. Мухин, В. Ю. Новиков, А. М. Мухортова и др. // В кн. Камчатский краб в Баренцевом море. / Изд. 3-е, перераб. и доп. – Москва: ФГБНУ «ВНИРО», 2021. – С. 391-452.
3. Collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator*. Purification and properties / A. Z. Eisen, K. O. Henderson, J. J. Jeffrey, R. A. A. Bradshaw // *Biochemistry*. – 1973. – V. 12, N 9. – P. 1814-1822. <https://doi.org/10.1021/bi00733a024>.
4. Preparation of proteolytic enzymes from kamchatka crab *Paralithodes camchatica* hepatopancreas and their application / G. N. Rudenskaya, V. A. Isaev, A. M. Shmoylov et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2000. – V. 88, N 1. – P. 175-183. <https://doi.org/10.1385/ABAB:88:1-3:175>.
5. Kim S.-K. Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus* // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – V. 35, N 6. – P. 576-582. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.6.576>.
6. Blatt W. F. Ultrafiltration for enzyme concentration // *Meth. Enzymol.* – 1971. – V. 22. – P. 39-49. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)22008-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)22008-5).
7. Novikov V. Yu., Mukhin V. A., Rysakova K. S. Properties of chitinolytic enzymes from the hepatopancreas of the Red King Crab (*Paralithodes camtschaticus*) // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2007. – V. 43, N 2. – P. 159-163. <https://doi.org/10.1134/S0003683807020056>.
8. Investigation of lipolytic activity of the red king crab hepatopancreas homogenate by NMR spectroscopy // М. Timchenko, V. Molchanov, М. Molchanov et al. // *Peer J.* – 2022. – V. 10. – Art. ID: e12742. <https://doi.org/10.7717/peerj.12742>.
9. β -elimination of hyaluronate by red king crab hyaluronidase / D. Sliadovskii, Т. Ponomareva, М. Molchanov et al. // *Sci. Rep.* – 2021. - V. 11. – Art. ID: 22600. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01890-3>.
10. Purification and some properties of elastase from hepatopancreas of king crab *Paralithodes camtschatica* / I. Yu. Sakharov, A. V. Dzunkovskaya, A. A. Artyukov, N. N. Zakharova // *Comp. Biochem. Physiol. B, Comp. Biochem.* – 1993. – V. 106, N 3. – P. 681-684. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90149-Y](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90149-Y).
11. Рысакова К. С. Хитинолитическая активность ферментов у некоторых беспозвоночных Баренцева моря: диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.04 / Рысакова Кира Сергеевна; [Место защиты: Карел. гос. пед. ун-т].- Мурманск, 2008.- 145 с.: ил. РГБ ОД, 61 08-3/721.
12. Jeuniaux C. Chitinase of vertebrates and invertebrates // *Arch. Int. Physiol. Biochem.* – 1963. – V. 71. – P. 307.
13. Novikov V. Yu., Mukhin V. A. Defatting and clarification of protein hydrolysates by using chitosan solutions // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2001. – V. 37, N 6. – P. 629-634. <https://doi.org/10.1023/A:1012367520667>.
14. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 335 с.
15. *Highly Selective Separations in Biotechnology* / G. Street (Ed.). – Chapman and Hall: London, 1994. – 244 p.
16. Cheba B. A. Microbial chitinases purification: conventional protocols and affinity-based strategies (Review) // *World J. Fish. Mar. Sci.* – 2015. – V. 7, N 6. – P. 458-461. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2015.7.6.1013>.
17. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes / K. Yanai, N. Takaya, N. Kojima et al. // *J. Bacteriol.* – 1992. – V. 174, N 22. – P. 7398-7406. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7398-7406.1992>.
18. Affinity purification and immobilization of chitinase from *Bacillus* sp. R2 / Cheba B. A., Zaghloul T. I., El-Mahdy A. R., El-Massry M. H. // *Proc. Technol.* – 2015. – V. 19. – P. 958-964. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2015.02.137>.

19. Kashyap P., Deswal R. A novel class I Chitinase from *Hippophae rhamnoides*: Indications for participating in ICE-CBF cold stress signaling pathway // *Plant Sci.* – 2017. – V. 259. – P. 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.03.004>.
20. Gupta R., Deswal R. Refolding of β -stranded class I chitinases of *Hippophae rhamnoides* enhances the antifreeze activity during cold acclimation // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, N 3. – Art. ID: e91723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091723>.
21. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost / K. Sakai, A. Yokota, H. Kurokawa et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64, N 9. – P. 3397-3402. <https://doi.org/10.1128/aem.64.9.3397-3402.1998>.
22. Teotia S., Lata R., Gupta M. N. Chitosan as a macroaffinity ligand: Purification of chitinases by affinity precipitation and aqueous two-phase extractions // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1052, N 1-2. – P. 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.096>.
23. Новиков В. Ю., Коновалова И. Н., Долгопятова Н. В. Химические основы технологии получения хитина и его производных из панциря ракообразных. – СПб : ГИОРД, 2012. – 208 с.
24. Hirano S., Ohe Y., Ono H. Selective N-acylation of chitosan // *Carbohydr. Res.* – 1976. – V. 47, N 2. – P. 315-320. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)84198-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)84198-1)
25. SU 1343591 Способ получения коллагеназы / И. Ю. Сахаров, А. В. Джунковская и др. / Институт иммунологии и ТИБОХ АН СССР. МПК А 61 К 35/56. Заявл. 13.12.1985, № 3992368/14, Опубл. 30.04.1992.
26. Polysaccharide-degrading enzymes from marine gastropods / T. Ojima, M. N. Rahman, Y. Kumagai et al. // In: *Methods in Enzymology*. Vol. 605/ Ed. by B. S. Moore. - Elsevier Inc., 2018. – P. 457-497. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.01.032>.
27. Лисицын А. Б., Иванкин А. Н., Неклюдов А. Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. – М.: ВНИИМП, 2001. – 408 с.
28. Reissig J. L., Strominger J. L., Leloir L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars // *J. Biol. Chem.* - 1955. - V. 217, N 2. - P. 959-966. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65959-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65959-9).
29. Determination of endo- and exochitinase activities of *Serratia marcescens* in relation to the culture media composition and comparison of their antifungal properties / M. Declaire, W. De Cat, V. H. Tang et al. // *Chitin Enzymology*. Vol. 2 / Ed. by R. A. A. Muzzarelli. – Grottammare, Italy: Atec Edizioni, 1996. – P. 165-169.
30. ГОСТ 7636-85 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. – М.: Изд-во стандартов, 1985. – 141 с.

ISOLATION AND FRACTIONATION OF CHITINOLYTIC ENZYMES FROM THE HEPATOPANCREAS OF THE RED KING CRAB

¹Rysakova Kira Sergeevna, PhD, researcher

²Novikov Vitaly Yurievich, PhD., Leading researcher

³Shumskaya Nadezhda Vladimirovna, specialist

Polar Branch of VNIRO (N.M. Knipovich PINRO),
Murmansk, Russia, e-mail: ¹rysakova@pinro.ru

*Isolation and fractionation of chitinolytic enzymes from the hepatopancreas of the Red King crab *Paralithodes camtschaticus* have been studied in order to select operations for the implementation of industrial technology for obtaining an enzyme preparation. The methods of sedimentary separation of hepatopancreas with subsequent ultrafiltration and affinity adsorption were used to concentrate protein fractions containing chitinolytic enzymes. The enrichment after ultrafiltration was 864 times. The properties of chitinolytic enzymes have been studied. The results of the work showed the possibility of obtaining an enzyme preparation with chitin.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ В СОСТАВЕ БЕЗДЫМНЫХ КОПТИЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КОПЧЕНИЯ РЫБЫ

¹Самбурская Надежда Вадимовна, студентка направления «Биотехнология»

²Мезенова Ольга Яковлевна, д-р техн. наук, профессор

³Томас Мерзель, д-р наук, профессор

^{1,2}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»,

Калининград, Россия, e-mail: ¹nadyasamburskaya@outlook.com; ²mezenova@klgtu.ru

³Исследовательско-консультационная лаборатория UBF GmbH, Альтландсберг, Германия, e-mail: ³thomas.moersel@ubf-research.com

*Проведен анализ специальной литературы в области применения и использования красных водорослей. Изучен физико-химический состав красной водоросли *Furcellaria lumbricalis* Балтийского моря и коптильной среды «Жидкий дым». Исследовано приготовление рыбы горячего копчения с применением желеобразной коптильной среды на основе водорослевого экстракта и «Жидкого дыма». Проведена оценка качества копченой продукции по органолептическим и физико-химическим показателям.*

Актуальность. Биопотенциал красных водорослей в нашей стране недостаточно используется в пищевой промышленности. Между тем, они содержат большое количество биологически активных веществ (БАВ), полезных в питании человека. Это: сульфатированные полисахариды (агар, каррагинаны), витамины (С, Е, К витамины группы В), минеральные вещества (бром, йод, калий, магний, железо, кальций) и другие БАВы (каротиноиды, лютеин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин). Полисахариды красных водорослей применяются в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Они не токсичны, биосовместимы, способны к биодеградации, обладают иммуномодулирующей, противоопухолевой, противовирусной активностью. За счет высокого содержания функциональных свойств каррагинаны используются в качестве структурообразователей и стабилизаторов консистенции, что важно в технологиях колбасных и кондитерских изделий, молочных продуктов, джемов, желе, кормов для животных и др. Этот природный загуститель обладает высокой влагоудерживающей способностью, за счет чего возможно увеличивать вязкость и адгезионные свойства водных растворов пищевых систем [1].

Перспективным направлением в пищевой биотехнологии является бездымная технология копчения. Обработывая пищевое сырье бездымными коптильными средами, можно получить экологически безопасную копченую продукцию, поскольку в процессе их изготовления предусмотрено удаление и контроль остаточного содержания полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Использование бездымных коптильных сред с известным химическим составом способствует повышению эффективности процесса копчения за счет интенсификации образования органолептических эффектов и сокращения времени изготовления продукции [2].

Целью исследования являлось изучение биопотенциала красной водоросли Балтийского моря *Furcellaria lumbricalis* и возможности его применения в составе бездымной коптильной среды, предназначенной для изготовления рыбного продукта горячего копчения повышенной пищевой ценности.

Для проведения исследований собирали красные водоросли *Furcellaria lumbricalis* на побережье Балтийского моря, у мыса Таран (поселок Донское, Калининградская обл.) Внешние признаки водоросли: слоевище цилиндрическое дихотомически разветвленное, плотное, хрящевидное с ризоидоподобными выростами, почти черного цвета, в проходящем свете коричневатого цвета. Водоросли высушивали и использовали в исследованиях в сушеном и измельченном виде.

Исследования проводились в исследовательско-консультационной лаборатории UBF GmbH, г. Альтландсберг (Германия) в период с июля по сентябрь 2022 года.

Определяли следующие показатели:

1. Определение содержания металлов (в т.ч. тяжелых, SOP 3.IV.42_0) проводилось путем добавления HNO₃ 65% и разложением образца в микроволновой печи. Конечный этап- атомно-адсорбционная спектроскопия и масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой.

2. Определение содержания аминокислот (SOP IV.42) проводилось путем добавления 32% раствора HCl, разложением образца в микроволновой печи и нейтрализацией водным раствором KOH. Конечный этап- высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия.

3. Определение общего содержания фенолов с помощью фолинового реагента (SOP 3.IV.18) путем точного пипетирования фолинового реагента, 0,5 моль/л NaOH и дистиллированной воды в определенных пропорциях для дальнейшего фотометрического анализа.

4. Определение общего числа каротиноидов (SOP 3.IV.16) проводилось интенсивным встряхиванием пробы в делительной воронке с петролейным эфиром до полного обесцвечивания верхней эфирной фазы, а затем встряхиванием эфирной фазы с дистиллированной водой до нейтральной среды. Конечный этап- фотометрическое определение при длине волны 450 нм.

5. Обнаружение водорастворимых витаминов (SOP 3.IV.07) проводилось с помощью ВЭЖХ с мобильной фазой- вода/ацетонитрил/уксусная кислота в отношении 255/45/3 мл.

6. Обнаружение жирорастворимых витаминов (SOP 3.IV.02) проводилось интенсивным встряхиванием пробы в делительной воронке с петролейным эфиром до полного обесцвечивания верхней эфирной фазы, а затем встряхиванием эфирной фазы с дистиллированной водой до нейтральной среды. Конечный этап- ВЭЖХ с мобильной фазой изооктан/ этилацетат в разном соотношении для каждого витамина.

7. При определении ПАУ (SOP 3.IV.33_2) предварительно проводили гидролиз (омыление) жиров в диметилформамидной воде DHF/H₂O (9:1), экстракция с циклогексаном. Из водной диметилформамидной фазы углеводороды реэкстрагируются с циклогексаном. Циклогексановый экстракт очищается через силикатный гель в столбчатой хроматографии. Разделение ПАУ происходит путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующим флуоресцентным детектированием индивидуальных представителей ПАУ и их количественным определением.

8. Определение основных показателей химического состава: сырая клетчатка (SOP 3.III.08) пропусканием горячего 80% р-ра уксусной кислоты, горячего этанола и холодного петролейного эфира через вакуумный насос; жир (SOP 3.III.10.1) на аппарате Сокслета; сахарозу (SOP 3.III.04) по методике Luff/Schoorl; белок (SOP 3.III.03_1) на анализаторе белка Gerhardt; общее число углеводов (SOP 3.III.04); сухой массы и воды (SOP 3.III.01) высушиванием в муфельной печи 4 часа при 550 °С).

Результаты исследования основных физико-химических показателей красной водоросли *Furcellaria lumbricalis* приведены в табл. 1.

Таблица 1

Химический состав сушеной красной водоросли *Furcellaria lumbricalis* Балтийского моря

Наименование показателя	Содержание, г/100 г
Белки	23,32
Жиры (%)	0,34
Общее число углеводов	58,58
Клетчатка	7,52
Сахароза	0,43
Крахмал	1,84
Минеральные вещества	2,62

Сухая масса исследованных водорослей составляет 81,95% от общего объема, соответственно, содержание воды- 18,05%. В состав сухой массы значительное содержание минеральных веществ, пигментов и других биологически активных веществ. Результаты исследования приведены в табл. 2.

**Результаты исследования минеральных веществ и пигментов
в структуре красной водоросли *Furcellaria lumbricalis* Балтийского моря**

Наименование показателя	Содержание, мг/100 г	MP 2.3.1.0253-21, мг/сут
Каротиноиды	1,8153	5
Лютеин	1,7	-
Кальций	1104,6	1000
Цинк	6,0	12
Марганец	23,5	2
Натрий	215,4	1300
Калий	518,8	3500
Магний	688,9	420
Хром	0,1	0,04
Медь	1,7	1
Йод	58,1	0,15
Тяжелые металлы		TP EAЭС 040/2016, не более мг/кг
Свинец	0,1	0,5
Кадмий	0,017	1,0
Мышьяк	0,362	5,0
Ртуть	0,001	0,1

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что водоросли являются экологически чистым сырьем, не загрязнены тяжелыми металлами (свинец, кадмий и др.), нормируемыми в техническом регламенте, что делает их безопасным сырьем для целей пищевой промышленности. В пересчете на 100 г. водоросль обеспечивает суточную норму здорового человека в таких минеральных веществах, как Ca, Mn, Mg, Cr, Cu, I [3].

Сырьем для получения рыбы горячего копчения бездымным способом с применением биопотенциала красных водорослей служила атлантическая треска, которую разделявали на филе и порционировали на кусочки 4×5 см.

Изначально водоросли промывали и замачивали в воде комнатной температуры 20-25°C в течение 2 часов. После набухания слоевища измельчали в электрическом гомогенизаторе до размера частиц 2-3 мм. Измельченные водоросли смешивали с водой в соотношении 1:13 и подвергали экстрагированию на ультразвуковой ванне, разогретой до 85°C в течение 2-4 часов. Надосадочную жидкость отфильтровывали и охлаждали до 30-60 °С. К свежеприготовленному экстракту добавляли бездымную коптильную среду «Жидкий дым» в соотношении 2:1. Образовывалась вязкая коптильная композиция с выраженным ароматом копчености, в которую поочередно окунались образцы рыбы и подвешивали в вертикальном положении для подсушки формирования своеобразной коптильно-водорослевой пленки. Обработанные таким образом кусочки трески подвергали тепловой обработке в течение 30-40 мин при температуре 110-130°C при постоянной циркуляцией воздуха [4]. Приготовленные образцы водорослевого экстракта, водорослево-коптильной композиции с «Жидким дымом» и рыбного продукта горячего копчения представлены на рис.1.



Рис. 1. Экспериментальные образцы коптильной композиции и копченой рыбы:
1-экстракт красной водоросли *Furcellaria lumbricalis*; 2- смесь экстракта и коптильного препарата
в соотношении 2:1; 3 –рыбный продукт горячего копчения

По результатам органолептической оценки готовый продукт имеет приятный вкус с нежным рыбным привкусом и насыщенным ароматом копчености. Внешний вид: цельные румяные куски рыбы, коричневато-оранжевого цвета, без трещин и других дефектов, с ровным «пленочным» покрытием; консистенция мягкая, нежная; при разжевывании содержимое легко образует во рту пищевой комок. При проглатывании кусочков остается приятное послевкусие копчености и натуральный рыбный привкус.

Положительным эффектом предложенного способа получения рыбы горячего копчения является повышенная вязкость коптильной композиции, что позволяет за счет роста ее адгезии наносить на поверхность рыбы необходимое количество коптильных веществ за один прием окунания. Повышение вязкости образующейся системы можно объяснить введением в систему полисахаридов с высокими структурообразующими свойствами и физико-химическими взаимодействиями, возникающими между компонентами водорослевого экстракта и коптильного препарата «Жидкий дым» при их смешивании.

Безопасность экспериментальных образцов, в том числе полученной бездымной коптильной среды была доказана в экспериментах по обнаружению полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) (табл.3). В ТР ЕАЭС 040/2016 нормируется содержание бен(а)пирена в копченых продуктах - не более 0,005 мг/кг [5]. В водорослевом экстракте, а также полученном рыбном продукте горячего копчения ПАУ отсутствовали, что свидетельствует о безопасности данной продукции по этому показателю. Полученные данные представлены в табл.3.

Таблица 3

Содержание некоторых ПАУ в составе коптильных сред и готовом продукте

Название	Жидкий дым «Костровок», мкг/кг	Водорослевый экстракт с жидким дымом, мкг/кг	Рыбный продукт горячего копчения, мкг/кг
Бенз(а)пирен	0,17	0	0
Бенз(б)флуорантен	0,16	0	0
Бенз(а)антрацен	1	0	0
Хризен	0,64	0	0

Общее количество фенолов в чистом жидком дыме «Костровок» составляет 1609 мг/100 г, а в копченом рыбном продукте 2,7 мг/100 г. Фенольная фракция сообщает продукту приятный вкус и аромат, а также проявляет антиокислительные и бактерицидные свойства [6].

Определение каротиноидов показало, что в готовом продукте они содержатся в количестве 0,2549 мг/100 г. Помимо биологически активной роли антиоксидантов каротиноиды в составе коптильной среды усиливают ее насыщенность коричневыми («копчеными») оттенками, а также повышают консервирующий эффект копчения за счет антиоксидантной функции [7].

В рыбном продукте также содержится природный антиоксидант лютеин (1,4 мг/100 г), витамины В₁ (1,8 мг/100 г) и В₂ (0,6 мг/100 г). Из макроэлементов, определенных в нем же, можно отметить повышенное содержание натрия (82 мг/100 г), калия (398,7 мг/100 г), магния (35,4 мг/100 г) и кальция (84,5 мг/100 г).

Таким образом, определенный химический состав рыбы горячего копчения, полученной бездымным способом с применением экстракта красных водорослей, свидетельствует о повышении биологической ценности готовой продукции, ее обогащении водорослевым экстрактом и коптильным компонентом. При этом копченая продукция вообще не содержит канцерогенных ПАУ, что позволяет считать ее полностью безопасной по регламентированным показателям (табл. 4). Последнее обстоятельство обуславливает ее высокий конкурентоспособный потенциал на рынке копченых изделий.

Результаты исследования физико-химических показателей трески горячего копчения с синергетическим эффектом

Наименование показателя	Содержание, г/100 г	ТР ЕАЭС 040/2016
Белки	22,69	Не менее 13 г
Жиры (%)	0,89	Не более 8 г
Сахароза	0,12	-
Углеводы	1,32	Не более 5 г
Сухая масса	24,01	-
Вода	75,99	Не более 83%
Фенольные компоненты	2,7	Не более 0,005 мг/кг
Энергетическая ценность 100 г, ккал	93	Не более 90-130 ккал
Тяжелые металлы	Содержание, мг/кг	ТР ЕАЭС 040/2016
Свинец	0	Не более 1,0 мг/кг
Кадмий	0	Не более 5,0 мг/кг
Мышьяк	0	Не более 0,2 мг/кг
Ртуть	0	Не более 0,5 мг/кг

Аминокислотный состав экспериментального образца рыбы горячего копчения, полученный с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, представлен в табл. 5.

Таблица 5

Аминокислотный состав трески горячего бездымного копчения, изготовленной с применением водорослево-копильной композиции

Аминокислота	Содержание, г/100 г белка
Аланин	0,43
Аргинин	1,16
Валин	2,17
Аспарагиновая кислота	0,36
Глутаминовая кислота	0,72
Тирозин	1,05
Глицин	0,36
Изолейцин	1,81
Лейцин	3,62
Лизин	2,57
Метионин	1,99
Орнитин	0,36
Фенилаланин	2,25
Серин	0,51
Таурин	2,86
Триптофан	0,43

Анализируя полученные данные по аминокислотному составу, можно отметить, что в составе продукта содержатся все незаменимые аминокислоты, много лизина (эта аминокислота исчезает при копчении за счет взаимодействия с копильными компонентами при традиционном копчении, а в продукте ее содержание оказалось велико).

Из данных следует, что по содержанию витамина В₁ 100 г рыбы горячего копчения на основе копильного дыма и водорослевого экстракта удовлетворяют суточную потребность организма в данном витамине на 20 %, что позволяет считать разработанный продукт функциональным по данному элементу. На 100 г продукта его содержание составляет 1,8 мг [3].

Проведенные исследования показали высокий биопотенциал красных водорослей Балтийского моря за счет содержания в них витаминов (группы В), минеральных веществ (бром, йод, калий, магний, железо, кальций), пигментов (каротиноидов, лютеина), в т.ч. БАВ, и их нетоксичности. Доказана биосовместимость водного водорослевого экстракта с копильным препаратом «Жидкий

дым» в соотношении 2:1 при получении коптильной композиции повышенной вязкости. Исследованы физико-химические показатели новой коптильной среды. Водорослево-коптильная композиция положительно апробирована при приготовлении рыбного продукта горячего копчения из кусочков трески за счет одноразовой обработки. Полученная копченая рыба обладает приятными органолептическими свойствами, повышенной питательной ценностью и безопасностью по содержанию основных полициклических ароматических углеводородов и тяжелых металлов. Установлено содержание в готовой продукции всех незаменимых аминокислот.

Таким образом, обогащение традиционной бездымной коптильной среды компонентами красных водорослей Балтийского моря *Furcellaria lumbricalis* позволяет получать копченую продукцию повышенной биологической ценности, не уступающую по органолептическим свойствам традиционной рыбе горячего копчения, которую можно рекомендовать для употребления широким слоям населения в качестве безопасного и полезного белкового продукта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Панина О.В. Особенности использования каррагинана в пищевом производстве//Научно-технический прогресс: актуальные и перспективные направления будущего. Сборник материалов V Международной научно-практической конференции. – Западно-Сибирский научный центр, 2017. - С. 119-120.

2. Мезенова О.Я. Технология и методы копчения пищевых продуктов. - Санкт-Петербург, изд-во «Перспектива», 2018. - 288 с.

3. Методические рекомендации МР 2.3.1.0253-21 "Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации". Вид документа - Методические документы Номер - № МР 2.3.1.0253-21 Дата принятия - 22.07.2021.

4. Сушина А. Д., Мезенова О. Я. Исследование получения и применения коптильной композиции на основе экстрактов красных водорослей *Furcellaria Lumbricalis*. // Вестник Международной академии холода. 2022. № 1. С.53–60.

5. Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции» № ТР ЕАЭС 040/2016. – 2012 [Электронный ресурс] <https://docs.cntd.ru/document/420394425> (дата обращения: 09.09.2022).

6. Мезенова О.Я., Потапова В.А. Обогащенные жидкие коптильные среды и их применение в пищевой биотехнологии рыбных продуктов. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, № 1 (12), Изд-во Иркутского нац.-исследов. технич. унив-та, 2015, С.46-53.

7. Подкорытова А.В., Фан Т.К. Пигменты и каррагинаны из красных водорослей// Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. -2010. -№ 3- С.74-78.

THE USE OF RED ALGAE AS PART OF SMOKELESS SMOKING MEDIA FOR SMOKING FISH

¹Samburskaya Nadezhda Vadimovna, student of the direction "Biotechnology"

²Mezenova Olga Yakovlevna, Doctor of Technical Sciences, Professor

³Thomas Mörsel, Doctor of Sciences, Professor

^{1,2}Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia,

e-mail: ¹nadyasamburskaya@outlook.com; ²mezenova@klgtu.ru

³UBF GmbH Research and Consulting Laboratory, Altlandsberg, Germany,

e-mail: ³thomas.moersel@ubf-research.com

*The analysis of special literature in the field of application and use of red algae carried out. The physicochemical composition of the red algae *Furcellaria lumbricalis* of the Baltic Sea and the smoky medium "Liquid smoke" studied. The preparation of hot smoked fish with the use of a jelly-like smoking*

medium based on algae extract and "Liquid smoke" investigated. The quality of smoked products assessed according to organoleptic and physico-chemical indicators.

УДК 664.66

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЦЕПТУРЫ БЕЗГЛЮТЕНОВОГО ХЛЕБОБУЛОЧНОГО ИЗДЕЛИЯ НА ОСНОВЕ РИСОВОЙ МУКИ

¹Суняйкина Анжелика Валерьевна, студентка кафедры пищевой биотехнологии

²Агафонова Светлана Викторовна, канд. техн. наук, доцент кафедры пищевой биотехнологии

^{1,2}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия, e-mail: ¹asunyaykina54@gmail.com

Разработана и оптимизирована рецептура безглютенового хлебобулочного изделия, изготовленного на основе рисовой и кукурузной муки, кукурузного крахмала. Установлено оптимальное количество вносимых компонентов (в % к массе рисовой муки): кукурузная мука – 7 %, кукурузный крахмал – 102 %. Полученное хлебобулочное изделие диетической направленности не содержит глютен, отличается стабильной структурой и достойными органолептическими характеристиками.

Введение

Постоянное увеличение числа страдающих алиментарно-зависимыми заболеваниями и приверженцев здорового питания привело к востребованности разработки и производства продуктов питания специализированного назначения. Ряд заболеваний значительно влияет на образ жизни, что в первую очередь сопровождается соблюдением строгой пожизненной диеты, исключающей продукты, содержащие аллерген, вызывающий дисфункцию организма. К таким заболеваниям относятся непереносимость глютена. За последние годы данное заболевание вызывает наибольший интерес в связи с увеличением его распространенности и опасной формой протекания, наблюдается скрытый процесс болезни, не сопровождаемый видимыми симптомами, но приводящий к серьезным повреждениям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1,2,6,9,10].

Согласно данным эпидемиологической статистики всемирной организации гастроэнтерологов (World Gastroenterology Organization) распространенность непереносимости глютена в популяции во всем мире варьируется в соотношении 1:100 – 1:300, высокая частота заболевания наблюдается в возрасте от 1 до 3 лет, у 17 % пациентов клинические проявления заболевания могут возникнуть в периоде беременности или в послеродовом периоде. Данные результаты свидетельствуют о стремительном развитии глютенной энтеропатии [3,4,7].

Глютен (клейковина) – водонерастворимый структурный белок злаковых культур, состоящий из глютенина и глиадина, из которых аллергеном является глиадин. Глютенная энтеропатия возникает в следствии недостатка ферментов для расщепления глютена, иммунитет вырабатывает антитела для обезвреживания глиадина, что приводит к его токсическому воздействию на ЖКТ. Различают три механизма формирования заболевания:

- целиакия, сопровождающаяся кишечным расстройством, приводящая к гистологическим изменениям тонкой кишки – атрофии кишечных ворсинок, с последующими осложнениями ЖКТ;
- нецелиакийная чувствительность к глютену – схожа с целиакией;
- аллергия на глютен пшеницы – проявляется в виде кишечной аллергии [1,5,7,8,9].

Медикаментозному лечению само заболевание не поддается, только его последствия. Единственным методом является соблюдение строгой пожизненной элиминационной диетотерапии.

В связи с этим стремительно развивается производство специализированных безглютеновых хлебобулочных, кондитерских и макаронных изделий, изготавливаемых путем замены компонентов на безглютеновые. Однако, технологии таких продуктов сопряжены с определенными сложностями. Высокая адсорбционная способность глютена влияет положительно на органолептические качества, газодерживающую способность теста, структурообразование и упруго-эластичные свойства, а также повышает пищевую ценность продукта. При исключении глютена из рецептуры данные свойства ухудшаются. Ввиду этого безглютеновому хлебобулочному изделию необходимо придать органолептические и физико-химические свойства, максимально приближенные к эталонному образцу, содержащим глютен. Обеспечить достаточную пористость, формообразующую способность, стабильную структуру, пищевую ценность и органолептические показатели возможно, подобрав правильное соотношение и количество безглютеновых ингредиентов [1,2,6,8,11].

Актуальной целью исследования явилась разработка и оптимизация рецептуры безглютенового хлеба с использованием ортогонального центрального композиционного плана (ОЦКП) второго порядка для двух факторов. В соответствии с положениями действующего технического регламента таможенного союза 027/2012 «О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции, в том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания», безглютеновые продукты питания относятся к группе пищевой продукции диетического профилактического действия, предназначенной для снижения риска развития заболеваний, уровень глютена в которых должен составлять не более 20 мг/кг.

Объекты и методы исследования

Опытные образцы были изготовлены при соблюдении следующих параметров: время расстойки 30 минут, температура в духовом шкафу при выпечке 140 °С, продолжительность выпекания 25 минут. Основу рецептуры составили ингредиенты, не содержащие глютен: рисовая мука, кукурузная мука, кукурузный крахмал, быстродействующие дрожжи. Эталонным образцом для органолептической оценки был выбран батон белый «Светлогорский» производства ОАО «Русский хлеб».

Моделирование и оптимизацию рецептуры безглютенового хлебобулочного изделия проводили в соответствии с матрицей ОЦКП второго порядка для двух факторов: содержания кукурузной муки и содержания кукурузного крахмала в % к массе рисовой муки. Факторы были выбраны ввиду их значительного влияния на органолептические и физико-химические показатели. Было отмечено, что кукурузный крахмал значительно влияет как на структуру теста, так и на вкусовые качества. Образцы с содержанием кукурузного крахмала 140 % к массе рисовой муки отличались плотной структурой, тесто при расстойке поднималось в 2 раза, не растекалось. Однако вкусовые качества были низкими, присутствовал отталкивающий запах. При изготовлении образцов с содержанием 60 % кукурузного крахмала к массе рисовой муки тесто было жидким, плохо поднималось при расстойке, растекалось, вкусовые качества удовлетворительные. При изготовлении изделий с содержанием 100 % кукурузного крахмала к массе рисовой муки тесто поднимается в 2 раза, не растекается, структура плотная, органолептические показатели приближены к хлебобулочным изделиям из пшеничной муки.

Количество внесенной кукурузной муки влияет на органолептические показатели, пористость и твердость: с увеличением содержания кукурузного крахмала от 4 до 12 % к массе рисовой муки уменьшается пористость изделий, растет их твердость и ухудшаются органолептические свойства.

В таблице 1 представлены изменяемые факторы при моделировании рецептуры безглютенового изделия и их пределы варьирования.

Таблица 1

Изменяемые факторы и предел их варьирования

Факторы	Уровни			Интервал варьирования
	-1	0	+1	
Массовая доля кукурузной муки, % к массе рисовой муки (M_{KM})	4	8	12	4
Массовая доля кукурузного крахмала, % к массе рисовой муки (M_{KK})	60	100	140	40

В качестве параметров оптимизации математической модели была выбрана безразмерная характеристика, объединяющая три частных отклика: влажность (В, %), пористость (П, %), органолептическая оценка (О, балл). «Идеальные» значения и размерность частных откликов приведены в таблице 2.

Таблица 2

Параметры оптимизации (частные отклики)

Наименование отклика	Размерность	«Идеальное» значение
Влажность (В)	%	44
Пористость (П)	%	70
Органолептическая оценка (О)	балл	15
Твердость (Т)	г	374

Массовую долю влаги определяли экспресс-методом на приборе Чижовой, высушиванием инфракрасными лучами при температуре 160 °С в течение 3 минут. Пористость определяли с помощью пробника Журавлева, метод основан на определении массы выемок и последующим вычислением пористости. Органолептическая оценка производилась путем дегустации десятью независимыми оппонентами по специально разработанной 15-ти бальной шкале, при этом учитывались вкус, запах, консистенция, цвет и вид на разрезе.

Определение структурно-механических свойства производили с помощью анализатора текстуры BROOKFIELD CT3, использовали цилиндрический зонд из плексигласа диаметром 25,4 мм, глубина погружения зонда составляла 10 мм, при этом оценивался показатель твердости (в г) мякши изделия.

Результаты исследования

Таблица 3

План эксперимента по моделированию рецептуры безглютенового хлебобулочного изделия и результаты его реализации

№ опыта	План эксперимента		Частные отклики				Частные безразмерные отклики				Обобщенный параметр оптимизации, у
	М _{км} , %	М _{кк} , %	В, %	П, %	О, балл	Т, г	S _В ²	S _П ²	S _О ²	S _Т ²	
1	12	140	42,0	75,0	4,5	1270,0	0,0021	0,0051	0,4900	5,7395	6,2367
2	4	140	42,1	76,0	10,8	997,0	0,0019	0,0073	0,0784	2,7748	2,8624
3	12	100	39,7	77,0	6,8	714,0	0,0094	0,0100	0,2988	0,8264	1,1447
4	4	100	41,0	73,0	6,5	970,0	0,0047	0,0018	0,3211	2,5395	2,8672
5	12	60	44,1	70,0	7,0	394,0	0,0000	0,0000	0,2844	0,0029	0,2873
6	4	60	43,8	60,0	9,3	597,0	0,0000	0,0204	0,1444	0,3555	0,5204
7	8	100	43,3	77,0	14,3	270,0	0,0003	0,0100	0,0022	0,0773	0,0898
8	8	140	40,8	72,0	12	1155,0	0,0052	0,0008	0,0400	4,3607	4,4068
9	8	60	45,5	70,0	7,3	90,0	0,0012	0,0000	0,2635	0,5766	0,8413

В результате математической обработки представленных в таблице 3 данных была получена полиномиальная модель второго порядка в натуральном виде:

$$y = 22,8286 - 1,2778 * M_{км} - 0,3586 * M_{кк} + 0,0080 * M_{км} * M_{кк} + 0,0338 * M_{км}^2 + 0,0015 * M_{кк}^2,$$

где у – обобщенный параметр оптимизации;

M_{км} – содержание кукурузной муки, % к массе рисовой муки;

M_{кк} – содержание кукурузного крахмала, % к массе рисовой муки.

При дифференцировании уравнения в натуральном виде были рассчитаны оптимальные значения факторов:

- содержание кукурузной муки $M_{KM} = 6,9012 \%$ к массе рисовой муки;
- содержание кукурузного крахмала $M_{KK} = 101,899 \%$ к массе рисовой муки;

Представленная на рисунке 1 графическая модель подтверждает нахождение оптимальных значений факторов в области экстремума функции.

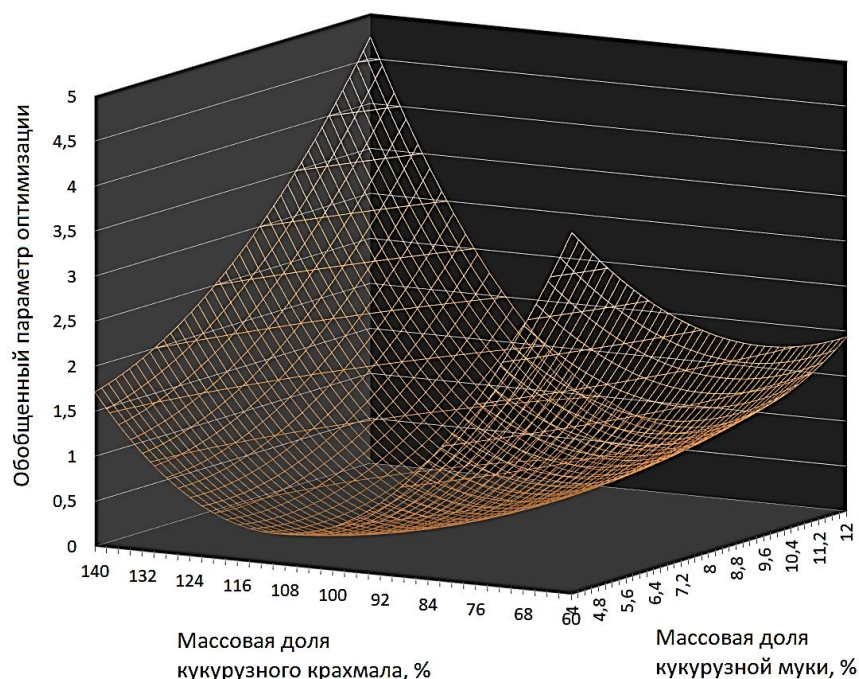


Рис. 1. Графическая интерпретация математической модели рецептуры безглютенового хлебобулочного изделия

Для удобства дозирования компонентов приняты: массовая доля кукурузной муки в рецептуре безглютенового хлебобулочного изделия 7 % к массе рисовой муки, массовая доля кукурузного крахмала – 102 % к массе рисовой муки. Внешний вид готового изделия представлен на рисунке 2.



Рис. 2. Внешний вид (на разрезе) безглютенового хлебобулочного изделия на основе рисовой муки, кукурузного крахмала и кукурузной муки

Заключение

Результатом проведенного исследования явилась рецептура хлебобулочного безглютенового изделия с оптимальным соотношением ингредиентов: рисовой и кукурузной муки и кукурузного крахмала.

Оптимальные количества каждого из компонентов составили (в % к массе рисовой муки): для кукурузной муки $M_{KM} = 7 \%$, для кукурузного крахмала $M_{KK} = 102 \%$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Масалова В.В. Перспективы использования безглютенового растительного сырья в производстве пищевых продуктов для диетического и профилактического питания [Текст] / В.В. Масалова, Н.П. Оботурова // Пищевая промышленность – 2016. - №3. – С. 16-20
2. Кузнецова Л.И. Разработка биотехнологии гипоаллергенных безглютеновых хлебобулочных изделий [Текст] / Л.И. Кузнецова, О.А. Савкина, О.И. Парахина, М.Н. Локачук // Вопросы питания – 2018. - №5. – С. 221- 223
3. Журавлева Е.О. Безглютеновый хлеб с мукой их семян расторопши [Текст] / Е.О. Журавлева, О.О. Пасько, Л.А. Козубаева // Ползуновский вестник – 2016. - №3. – С. 49-52
4. Ливзан М.А. Многоликая проблема непереносимости глютена [Текст] / М.А. Ливзан, М.Ф. Осипенко, Н.В. Заявкина, Т.С. Кролевец // Клиническая медицина – 2017. - №96(2) – С. 123-128
5. Зайцева Л.В. Современные подходы к разработке рецептур безглютеновых хлебобулочных изделий [Текст] / Л.В. Зайцева, Т.А. Юдина, Н.В. Рубан, В.В. Бессонов, В.С. Мехтиев // Лечебное питание – 2020. - №1. – С. 77-85.
6. Попов В.Г. Тенденции использования безглютеновых видов муки в производстве продукции функционального назначения [Текст] / В.Г. Попов, Н.Г. Хайруллина, Х.Н. Садыкова // Вестник ВГУИТ - 2021. - № 1. - С. 121–128.
7. Корниенко Е. А Нецелиакийная чувствительность к глютену [Текст] / Е.А. Корниенко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтология – 2017. - №3. – С. 89-98
8. Smidova, Z. Gluten-Free Bread and Bakery Products Technology [Текст] / Z. Smídova, J. Rysova, J. // Foods – 2022. - №11. – С. 1-18
9. Лысиков Ю.А. Непереносимость глютена с позиций физиологии пищеварения [Текст] / Ю.А. Лысиков // Эффективная фармакотерапия. Гастроэнтерология. – 2020. - №1. – С. 32-38.
10. Росланцев Е.А. Современное представление о формах непереносимости глютена [Текст] / Е.А. Росланцев, Е.А. Сабельникова // Российский педиатрический журнал. – 2013. - №1. – С. 50-55
11. Шнейдер, Д. В. Теоретические и практические аспекты создания безглютеновых продуктов питания на основе повышенной биодоступности сырья: автореф. дис, д-ра техн. наук [Текст] / Д. В. Шнейдер. – М.: Московский гос. ун-т технологий и управления имени К. Г. Разумовского, 2013. – С. 44.

OPTIMIZATION OF THE RECIPE OF GLUTEN-FREE BAKERY PRODUCTS BASED ON RICE FLOUR

¹Sunyajkina Anzhelika Valer'evna, student

²Agafonova Svetlana Viktorovna, PhD, Associate Professor of Food Biotechnology

^{1,2}Kaliningrad State Technical University,

Kaliningrad, Russia, e-mail: ¹asunyaykina54@gmail.com

The formulation of gluten-free bakery products made on the basis of rice flour, corn flour, corn starch has been developed and optimized. The optimal amount of introduced components (in % by weight of rice flour) has been established: corn flour – 7 %, corn starch – 102 %. The resulting bakery product of dietary orientation does not contain gluten, has a stable structure and decent organoleptic characteristics.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОПТИЛЬНО-ВОДОРОСЛЕВОЙ КОМПОЗИЦИИ ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ РЫБЫ ГОРЯЧЕГО КОПЧЕНИЯ

¹Сушина Анастасия Дмитриевна, аспирант

²Мезенова Ольга Яковлевна, д-р техн. наук, профессор

^{1,2}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»,
Калининград, Россия, e-mail: ¹nastenka-1997@bk.ru; ²mezenova@klgtu.ru

*Исследованы реологические характеристики коптильной композиции, приготовленной на основе коптильного препарата «Жидкий дым» и экстракта красных водорослей Балтийского моря *Furcellaria Lumbriicalis*. Коптильно-водорослевая композиция имеет структуру вязкого коллоидного раствора, характеристики которого зависят от соотношений основных компонентов системы. В модельных экспериментах оценено влияние коптильной композиции на показатели качества образцов рыбы горячего копчения. По результатам исследований рекомендована коптильная композиция с рациональным соотношением компонентов.*

В настоящее время к направлениям научно-технического прогресса пищевой промышленности относятся технологии, которые способствуют повышению качества получаемых изделий, улучшению эффективности процесса производства, уменьшению пагубного влияния на окружающую среду. Одной из таких технологий является бездымное копчение рыбы с применением экологически безопасных коптильных сред с высокими функциональными свойствами.

Перспективным является создание коптильной композиции на основе смеси коптильного препарата и экстракта красных водорослей *Furcellaria lumbriicalis*, что придает коптильной среде повышенную вязкость, выраженный цвет, а также обогащает ее биологически активными веществами (каротиноиды, каррагинаны, минеральные вещества и др.). Такая коптильная среда положительно зарекомендовала себя в производстве рыбы горячего копчения. Готовая продукция имеет улучшенные показатели качества, при этом за счет однократного нанесения коптильной среды процесс собственно копчения упрощается, что повышает его эффективность [1,2].

Одним из основных достоинств получаемой коптильно-водорослевой композиции является ее повышенные вязкость и адгезия, обусловленная наличием полисахаридного структурообразователя каррагинана, привносимого с экстрактом красных водорослей *Furcellaria lumbriicalis*. При получении коптильной композиции с заданными реологическими характеристиками важно определить рациональное соотношение в ней всех компонентов (коптильного препарата, водорослевого экстракта и воды). При этом важно, чтобы композиция обладала всеми свойствами натуральной коптильной среды – красящим и вкусо-ароматическим эффектами, не имела отрицательных или не свойственных копчению признаков (водорослевого, йодистого и др.).

В связи с введением в состав традиционной жидкой коптильной среды «Жидкий дым» нетрадиционных для копчения водорослевых компонентов, влияющих на ее консистенцию, важно оценить ее реологические характеристики и рекомендовать наиболее рациональные, которые наилучшим образом будут способствовать образованию заданных эффектов в рыбе горячего копчения.

Все пищевые продукты являются сложными многокомпонентными дисперсными системами, которые обладают внутренней структурой и реологическими свойствами. Реологические свойства каждого отдельного продукта зависят от факторов химического состава, температуры, продолжительности механического воздействия [3].

Пищевое сырьё (коптильная среда, рыба) является биологическим материалом. В процессе производства (приготовление коптильного коллоидного раствора, рыбы горячего копчения) оно подвергается воздействию физического, биохимического и химического процессов, за счёт чего

происходит изменение структурных и механических свойств и формирование требуемых реологических свойств. Их исследование позволяет получить механическую модель реального тела, выделить свойства, подлежащие изучению [3].

К наиболее важным реологическим характеристикам для получаемой коптильно-водорослевой композиции, предназначенной для нанесения на рыбу в процессе собственно копчения при изготовлении рыбы горячего копчения, относятся адгезия и вязкость.

Вязкость – способность тела оказывать сопротивление относительно смещению его слоёв, мера интенсивности сил внутреннего трения. [3]. Показатель вязкости характеризует способность коптильно-водорослевой композиции за счет текучести обволакивать продукт, нанося требуемые функциональные компоненты на ее поверхность. Так же вязкость играет важную роль в процессах микрореологического затекания адгезива (коптильной среды) в структуру тканей субстрата.

Адгезией называют способность слипания разнородных твёрдых или жидких тел, соприкасающихся своими поверхностями [4]. Она является важнейшей характеристикой коптильно-водорослевой композиции, которая описывает прочность прилипания и удержания адгезива на поверхности рыбы и обуславливает её целесообразность использования в технологии бездымного адгезивного копчения.

При обосновании состава коптильной композиции и исследовании ее реологических свойств ориентировались на количественные характеристики вязко-текучих жидкостей, обладающих высокими значениями показателей вязкости и адгезии (йогурт, соуса и др.). В исследовании авторов Шлейкина А.Г. и др. изучались реологические характеристики йогурта с жирностью 0,05%. Из данных следует, что йогурт имел адгезию 552,6 мДж, а вязкость 248,4 сПз. Забодалова Л.А. и др. исследовали реологические характеристики творожного продукта с пастообразной консистенцией, вязкость составила 718,3 сПз, адгезия не изучалась. Данные показатели в приведенных примерах близки к желаемым в проектируемой коптильно-водорослевой композиции [5,6].

Цель работы заключалась в изучении реологических свойств коптильно-водорослевой композиции, приготовленной на основе коптильного препарата «Жидкий дым» и экстракта красных водорослей *Furcellaria Lumbri-calis*, а также определении наиболее рационального соотношения компонентов в ней с учетом оценки ее функционального воздействия при приготовлении рыбы горячего копчения.

Основные исследования проводились на кафедре пищевой биотехнологии КГТУ. В качестве объектов исследования использовались:

- образцы коптильной композиции на основе экстракта красной водоросли *Furcellaria lumbri-calis* с коптильным препаратом «Жидкий дым», приготовленные по отработанной ранее технологии [7] и различным режимам (таблица 1). При приготовлении образцов коптильной композиции было выбрано 3 соотношения ее основных составляющих. В образцах варьировалось содержание воды и сухих водорослей, при этом соотношение экстракта водоросли и коптильного препарата было одинаковым для всех образцов;

- образцы салаки (балтийская сельдь) и скумбрии, обработанные экспериментальной коптильной композицией в процессе получения рыбы горячего копчения.

Таблица 1

Соотношения исследуемых образцов коптильной композиции

Образец	Ингредиент			Соотношение: «сушеная водоросль: вода»	Соотношение «экстракт: коптильный препарат»
	Водоросль <i>Furcellaria Lumbri-calis</i> , г	Вода, мл	Коптильный препарат «Жидкий дым», мл		
1	10	50	10	1:5	3:1
2		130	35	1:13	
3		200	60	1:20	

Реологические характеристики образцов изучались на анализаторе текстуры Brookfield CT3 с использованием методического приложения к оборудованию. Основным зондом, использованным при измерении показателей, являлся цилиндр.

В готовых модельных образцах копченой рыбы оценивали органолептические характери-

стики (внешний вид, цвет, консистенция, запах и вкус) в сравнении с ГОСТ 7447-2015 «Рыба горячего копчения»), а также степень приближения к показателям рыбы, выкопченной традиционным методом с применением коптильного дыма.

Согласно классификации пищевых продуктов по текстурным признакам водорослево-копильную композицию можно отнести к вязко-пластичным телам. В эту категорию входят такие продукты, как сметана, кисели, майонезы, соуса. Для таких структурных систем типичными реологическими свойствами являются: адгезия, вязкость [3,8]. По другой классификации образцы водорослево-копильной композиции относятся к жидкообразным продуктам, что обусловлено наличием в своём составе структурообразующего компонента (каррагинанов). Такие структуры способны разрушаться под действием внешних сил. Описание поведения реологических свойств таких моделей затруднено, поскольку они способны проявлять себя различно, в зависимости от состава и условий воздействия на заданный объект [3].

В таблице 2 приведены некоторые реологические характеристики полученных коптильных композиций. В период исследований температура образцов составляла 23°C, объём проб 30 мл, целевая нагрузка 5 г, в качестве зонда использовался цилиндр малый. Исследования образцов проводили в исходных контейнерах для предотвращения искажения результатов.

Таблица 2

Реологические характеристики образцов коптильно-водорослевой композиции

Образец ¹	Показатели				Деформация, мм
	Пиковая нагрузка 1-го цикла сжатия ² , г (A1)	Пиковая нагрузка 2-го цикла сжатия ³ , г (A2)	Эластичность	Вязкость, сПз	
1	16	12	0,75	1246	0,2
2	12	12	1,0	492	2.8
3	3	2	0,66	128	0.3

Примечание:

¹ – описание образцов смотри в табл. 1

² - максимальная нагрузка, которую выдерживает образец при первом сжатии

³ - максимальная нагрузка, которую выдерживает образец при втором сжатии (характеризуют прочностные свойства продукта) [3].

Нагрузки сжатия, приведённые в таблице 2, показывают поведение коптильно-водорослевой композиции в момент воздействия пиковой нагрузки сжатия. Данный вид нагрузки называется обратной экструзией и позволяет охарактеризовать прочность жидкообразных продуктов, способность сохранять целостность структуры и не подвергаться деформации [3,4]. Так, в образце 1 в момент воздействия сил сжатия наблюдается высокая разница, свидетельствующая о частичном разрушении структуры. В образце 2 значения пиковых нагрузок одинаково, что свидетельствует о сохранении целостности структуры. Образец 3 демонстрирует незначительную разницу значений нагрузок сжатия, но такое поведение, возможно, связано с маловязкой структурой и неоднородностью.

Эластичность представляет собой отношение 2-й пиковой нагрузки сжатия к 1-й (A2/A1). Если происходит разрушение структуры образца, то это отношение приближается к 0. Если отношение равно 1, то образец считается эластичным [3]. Как видно из таблицы 2, образец 2 не разрушается под действием сил сжатия и отношение A2/A1=1, следовательно образец обладает свойством эластичности [3,9].

Также результаты показали, что деформация коптильно-водорослевой композиции в образцах различна. Образец 1 начинает деформироваться при величине погружения индентора 0,2 мм и максимально выдерживает нагрузку 28 г через 5 с после начала испытания, при дальнейшем увеличении нагрузки происходит разрушение структуры. Образец 2 деформироваться начинает при погружении индентора на 2,8 мм и выдерживает нагрузку в 41 г после 15 с воздействия, а затем переходит к течению, сохраняя целостность структуры. Образец 3 деформируется на глубине 0,3 мм после 5 с и выдерживает нагрузку в 5 г.

Образец 1, по данным таблицы 2, имеет наиболее высокие значения вязкости, что характеризует его высокую сопротивляемость перемещению частей относительно друг друга. Образец 2 имеет относительно первого вариант пониженную вязкость, схожую количественно со значением

для йогурта (от 400 до 600 сПз). Образец 3 обладал наименее низкой вязкостью, повышенной текучестью, его значение близко к значению для растительного масла (около 100 сПз) [3].

Значения показателя адгезии различных образцов копильной композиции, оцененные по степени прилипания к зонду анализатора текстуры, и характеризующие потенциальную адгезионную связь между адгезивом и объектом обработки, приведены в табл.3.

Таблица 3

Показатели величины адгезии копильной композиции в зависимости от продолжительности контакта субстрата с адгезивом

Образец ¹	Адгезия, мДж, при продолжительности контакта:			
	10 с	20 с	30 с	40 с
1	2902.4	3454.2	4147.8	3968.6
2	1299.5	2836.5	3621.4	2297.9
3	823.4	701.1	523.6	298.7

Примечание:

¹ – описание образцов смотри в табл. 1

Из данных табл. 3 видно, что в образцах 1 и 2 максимальная адгезия достигалась при воздействии в 30 с. При дальнейшем увеличении времени воздействия адгезия уменьшалась. Снижение прочности связи между адгезивом и субстратом может быть связано с возрастанием когезионной прочности между молекулами внутри адгезива при росте выдержки на гладкой поверхности зонда [9]. В практике получения продукта, например, рыбы горячего копчения, эти показатели могут иметь другие значения, в зависимости от качества обрабатываемой поверхности. Так, при наличии шероховатой и развитой структуры микрорельефа субстрата (например, у рыбы), изменяется доступность к поверхности субстрата, за счёт чего увеличивается площадь межфазного контакта и происходит затекание адгезива в структуру субстрата. Так как зонд (условный субстрат) имел гладкую поверхность, возможно, из-за этого фактора произошло снижение адгезии в образцах 1 и 2. В маловязком образце 3 высокой адгезионной способности при всех продолжительностях выдержки не установлено, что свидетельствует о низкой связи между адгезивом и субстратом.

На рисунке 1 изображён график зависимости величины адгезии от продолжительности контакта зонда с адгезивом.

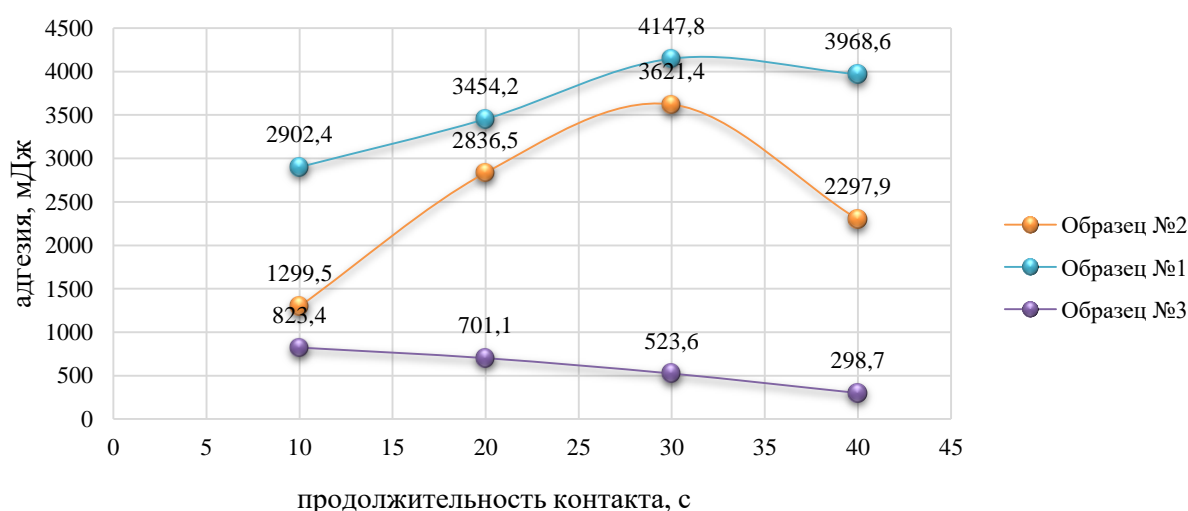


Рис.1. Зависимость величины адгезии от продолжительности контакта зонда с адгезивом

Таким образом, можно констатировать, что образец 1 имеет высокие вязкие и адгезионно-когезионные свойства, за счёт которых способность «прилипать» растёт по мере продолжительности контакта. Образование на поверхности зонда налипших, плотных гелевых комочков и снижение эластичности свидетельствует о процессе отверждения – гелеобразования, что отрицательно может повлиять на качество готовых изделий – рыбы горячего копчения. Образец 2 характеризуется относительно высокими вязко-адгезионными свойствами, обладающими признаками эластичности и

тиксотропности (способностью снижать вязкость от механического воздействия и повышать в состоянии покоя), что желательно для копильной композиции. Образец 3 имеет маловязкую консистенцию и с низкой адгезией и способностью прилипнуть на субстрат [3,8,9,10].

Как видно из полученных результатов, происходят изменения реологических свойств образцов в зависимости от длительности воздействия, что позволяет их отнести к реологически нестационарным пищевым продуктам [3,10].

На следующем этапе исследований проводилась оценка консистенции рыбы, обработанной модельными образцами копильной композиции в режиме горячего копчения.

В период исследований температура образцов составляла 20-25°C, объём проб 30 мл, целевая нагрузка 10 г, в качестве зонда использовали ножевое полотно, рекомендуемое для определения консистенции мясных и рыбных изделий. Полотно вводилось в филейную часть (посередине) для всех образцовы рыб. На поверхности образцов, к моменту исследований, уже была образована подсушенная плёнка из копильно-водорослевого адгезива, плотно прилегающая к поверхности рыбы.

Для исследований использовали рыбу потрошённую, разрезанную на кусочки диаметром в 3 см. Кусочки подвергали посолу, подсушке, окунанию в заранее подготовленные образцы копильной композиции и тепловой обработке при температуре 110°C. После охлаждения образцов до температуры 8-12 °C проводили их органолептическую и реологическую оценку. Полученные данные представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Характеристики консистенции образцов рыбы горячего копчения

Образец ¹	Показатели			
	Пиковая нагрузка 1го цикла сжатия, г ¹	Пиковая нагрузка 2го цикла сжатия, г ¹	Эластичность	Деформация, мм
Салака				
1	4800	3776	0,36	4,22
2	1590	1341	0,58	3,55
3	997	679	0,51	4,20
Скумбрия				
1	1766	1656	0,63	3,9
2	1470	1371	0,51	2,7
3	789	723	0,65	3,6

Примечание: ¹ – описание образцов и показателей смотри в табл. 1 и табл. 2

Величины нагрузки сжатия, приведённые в табл. 4, показывают поведение образцов рыбы в момент действия нагрузки. Из полученных данных видно, что все образцы имеют существенно отличающиеся показатели по пиковым нагрузкам. В зависимости от вида рыбы заметны различия в показателях деформации. За счёт более плотной консистенции образцов салаки требуется больше усилий сжатия, чем у скумбрии, так как рыба имеет меньшую жирность. В исследования Терещенко В.П. и др. значения деформации салаки составили от 4,59 мм до 1,94 мм, в зависимости от способа обработки [4,10,11].

На следующем этапе производили органолептическую оценку полученных изделий горячего копчения, где основное внимание уделялось образованию цвета, как приоритетному показателю качества (табл.5).

Таблица 5

Органолептические характеристики образцов рыбы горячего копчения

Наименование показателя	Образец ¹		
	1	2	3
Салака			
Готовность продукта	мясо проварено; легко отделяется от костей и позвоночника; кровь полностью свернулась		
Внешний вид	поверхность неровная, наличие плотных комков	поверхность ровная, чистая, ровная; наличие плёнки	поверхность ровная, чистая
Наружные повреждения	рыба без наружных повреждений, кожный покров цел		
Цвет кожного	темно-коричневый,	светло-коричневый, равномерный	светло-золотой,

покрова	неравномерный		неравномерный
Консистенция	Плотная, сочная		
Вкус и запах	свойственный для рыбы горячего копчения, без постороннего привкуса и запаха		
Скумбрия			
Готовность продукта	мясо проварено; легко отделяется от костей и позвоночника; кровь полностью свернулась		
Внешний вид	поверхность неровная, с комками	поверхность ровная, чистая, ровная; наличие плёнки	поверхность ровная, чистая
Наружные повреждения	рыба без наружных повреждений, кожный покров цел		
Цвет кожного покрова	темный, неравномерный	насыщенный, золотисто-коричневый, наличие плёнки, равномерный	золотистый, неравномерный
Консистенция	плотная, сочная		
Вкус и запах	свойственный для рыбы горячего копчения, без постороннего привкуса и запаха		

Примечание: ¹ – описание образцов смотри в табл. 4

Из данных табл. 5 видно, что не все модельные образцы рыбы имели приятные и хорошо выраженные органолептические характеристики, что обусловлено воздействием характеристик наносимой копильной композиции, в том числе реологических.

Из-за низких значений адгезии образцы рыбы, обработанные 3-м образцом копильной композиции, не образовали цвета, свойственного рыбе горячего копчения, при этом на поверхности отсутствовала биополимерная плёнка. По-видимому, не произошло достаточно адгезионного сцепления между компонентами копильной композиции и поверхностью рыбы.

В образце рыбы 2 установлено образование биополимерной плёнки на поверхности рыбы и формирование с ее помощью заданного цвета и внешнего вида, требуемого для рыбы горячего копчения. При этом отсутствовало нарушение целостности покрова.

В образцах 1 имело место значительное образование плотных желеобразных комков на поверхности рыбы, которые ухудшали органолептические показатели готового продукта, а цвет поверхности был темно-коричневый, неравномерный.

Вывод. Исследование реологических характеристик копильной композиции на основе копильного препарата «Жидкий дым» и водного экстракта красных водорослей *Furcellaria Lumbriacalis* показало, что от соотношения вносимых компонентов зависят реологические характеристики копильной среды и органолептические свойства рыбы горячего копчения. Установлено рациональное соотношение компонентов копильной композиции, которое способствует образованию биополимерной плёнки на поверхности рыбы требуемого цвета за счёт заданного адгезионного взаимодействия с кожей рыбы в процессе собственно копчения. Определены количественные значения реологических показателей рекомендуемой копильной композиции, формирующей заданные органолептические свойства рыбы горячего копчения: вязкость 492 сПз; адгезия - от 1000 до 4000 мДж при продолжительности выдержки 30 с.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мезенова О.Я. Технология и методы копчения пищевых продуктов. - Санкт-Петербург: Проспект Науки, 2018. - 288 с.
2. Российские и мировые рынки рыбы и морепродукции по состоянию на 01.10.2021 год. 2021: [статистический сборник]. – М.: Росстат, М-45, 2021. – 98 с.
3. Еркебаев М.Ж. и др. основы реологии пищевых продуктов: учеб. пособие / М.Ж. Еркебаев, Т.К. Кулажанов, Е.Б. Медведков, - Алматы, 2006. – 298 с.
4. Структурно-механические характеристики пищевых продуктов: Справочник. – Мачихин С.А., Маслов А.М., Табачников В.П., Мачихин Ю.А., Косой В.Д. Под редакцией проф., д-ра техн. наук А. В. Горбатова. – М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1982. – 296 с.
5. Влияние сахарного сиропа, мёда и злаков на реологические свойства йогурта / А. Г. Шлейкин, Н. В. Баракова, М. Н. Петрова [и др.] // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. – 2015. – № 2. – С. 24-34.

6. Забодалова Л.А., Соловьева М.С. Реологические показатели творожного продукта по основанию обвинения // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств», 2010. - № 2. – С. 113-121.
7. Сушина А.Д., Мезенова О.Я. Исследование получения и применения копильной композиции на основе экстрактов красных водорослей *Furcellaria Lumbricalis*. // Вестник Международной академии холода, 2022. - № 1. - С.53-60.
8. Кузнецов О.А., Волошин Е.В., Сагитов Р.Ф. Реология пищевых масс: учебное пособие. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005. – 106 с.
9. Гуськов, К.П. Реология пищевых масс / К.П. Гуськов, Ю.А. Мачихин, С.А. Мачихин, Л. Н. Лунин. – Москва: «Пищевая промышленность», 1970. – 207 с.
10. Круподёров А.Ю., Николаева Л.К., Кузнецова А.В. Реологические характеристики аномально вязких пищевых продуктов и других сред // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств», 2014. - №4. – С.96-106.
11. Терещенко В.П., Яковлева Л.А., Петровский Д.В. Влияние уксусной кислоты на реологические свойства рыбы горячего копчения // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология, 1998. - №. 5-6. - С 58-59.

STUDY OF RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SMOKE-ALGAL COMPOSITION IN FISH PREPARATION HOT SMOKED

¹Sushina Anastasiia Dmitrievna, graduate student

²Mezenova Olga Yakovlevna, Doctor of Technical Sciences, Professor

^{1,2}Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia,
e-mail: ¹nastenka-1997@bk.ru; ²mezenova@klgtu.ru

*The rheological characteristics of the smoking composition prepared on the basis of the smoking preparation "Liquid smoke" and the extract of red algae of the Baltic Sea *Furcellaria Lumbricalis* were studied. Smoke-algal composition has structure of viscous colloidal solution, characteristics of which depend on ratios of main components of system. The effect of the smoking composition on the quality parameters of the hot smoked fish samples was evaluated in model experiments. According to the research results, a smoking composition with a rational ratio of components is recommended.*

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ОБЩУЮ КЛЕТОЧНОСТЬ КОСТНОГО МОЗГА И МИЕЛОГРАММУ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ

¹Тихонов Сергей Леонидович, д-р техн. наук, заведующий кафедрой пищевой инженерии

²Кольберг Наталия Александровна, канд. ветеринар. наук, доцент кафедры пищевой инженерии

³Тихонова Наталья Валерьевна, д-р техн. наук, профессор кафедры пищевой инженерии

⁴Лазарев Владимир Александрович, канд. техн. наук, доцент кафедры пищевой инженерии

^{1,2,3,4} ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»,
Екатеринбург, Россия, e-mail: ¹tihonov75@bk.ru

Работа посвящена исследованию физических характеристик белков, протеолитической активности экстракта фабрициевой сумки и его влиянию на общую клеточность костного мозга и миелограмму иммунодефицитных мышей. Полученный на холоде экстракт фабрициевой сумки анализировали при помощи гель-хроматографии. Концентрацию белка в экстракте определяли по методу Лоури с модификацией. Исследования проводили на мышах (самцы 3 месячного возраста по 5 мышей в каждой группе) линий СЗН, С57BL/6, С57BL/10, SJL. Установлено, что протеолитическая активность экстракта фабрициевой сумки цыплят-бройлеров составляет при 10-кратном разведении 4,68 ПЕ/мл. Доказано, что в экстракте фабрициевой сумки цыплят-бройлеров присутствуют пептиды с различной молекулярной массой. В 3 мл экстракта выделены пептиды с молекулярной массой 88,744 кДа, в 8 мл – 13,964 кДа и в 12 мл – 3,181 кДа. Оценка клеточного состава миелокариоцитов красного костного мозга мышей линии SJL с ЦФА-индуцированным иммунодефицитом на фоне 7-дневной терапии пептидами экстракта фабрициевой сумки свидетельствует о значимом повышении содержания клеток практически всех ростков кроветворения, исключение составляют эритробласты, клетки эозинофильного и мегакариоцитарного ростков, плазмоциты. После 7-дневного внутрибрюшинного введения пептидов отмечается достоверное увеличение общего числа миелокариоцитов у всех исследованных линий мышей с ЦФА-индуцированным иммунодефицитом. У мышей линии СЗН на 64,5 %, С57BL/6 – 56,2 %, С57BL/10 – 32,2 % и SJL – 43,8 %. Достоверное увеличение митозов в 5 раз отмечено у мышей линии СЗН. В ответ на введение пептидов отмечается значительная активация продукции и созревания эритроцитарного, нейтрофильного, базофильного, моноцитарного и лимфоцитарного ростков. Эозинофильный и мегакариоцитарный ростки реагируют не так активно, значимый рост числа их клеток наблюдается только у мышей линии С57BL/10.

Введение

Последние научные данные свидетельствуют о том, что пищевые белки не только служат питательными веществами, но и могут модулировать физиологические функции организма. Эти физиологические функции в основном регулируются некоторыми пептидами, которые зашифрованы в последовательностях нативного белка. Пептиды могут проявлять полезные для здоровья свойства и рассматриваются в качестве биологически активного соединения для разработки нутрицевтиков или функциональных продуктов питания. За последние несколько десятилетий был идентифицирован широкий спектр пептидных последовательностей пищевого происхождения. Однако коммерческое применение биоактивных пептидов было отложено из-за отсутствия подходящих и масштабируемых методов производства, надлежащего изучения механизмов действия, высокой усвояемости в желудочно-кишечном тракте и отсутствия клинических испытаний [1,2].

Недавние исследования продолжают демонстрировать потенциал животного сырья в качестве белковой основы для получения биоактивных пептидов. Авторами [3] проведено исследование

на выявление антигипертензивных, антигликемических и противовоспалительных пептидов, полученных из желудочно-кишечных гидролизатов белка съедобных насекомых. После последовательного фракционирования установлено, что субфракция переваривания белка с молекулярной массой <0,5 кДа, гидрофобные (C18) и катионные пептиды (IEХ) обладают высокой биологической активностью. Фракция катионного пептида значительно снижала ($p < 0,05$) активность α -амилазы, α -глюкозидазы и ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) *in vitro*, а также ингибировала экспрессию NF- κ B в необработанных 264,7 клетках макрофагов. В общей сложности 28 пептидов в гидролизате белка съедобного насекомого крикета были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии (LC-MS/MS) и секвенирования. Результаты этого исследования демонстрируют биоактивный потенциал съедобных пептидов крикета, особенно в качестве ингибиторов АПФ.

Авторами [4] получены белковые нутрицевтики путем высокотемпературного гидролиза говяжьего сырья в сочетании с энзимоллизом протеолитическими ферментными препаратами Alcalase 2,5 L, Protamex, Protosubtilin G3x. Все исследованные белковые добавки содержали пептиды с молекулярной массой не более 100 кДа. Количество низкомолекулярных олигопептидов с молекулярной массой менее 10 кДа в белковых добавках, полученных ферментативным термическим гидролизом, составило более 90%.

По данным исследований [5], биологически активные пептиды могут иметь различную функциональную направленность, в частности, обладать антиоксидантным, антигипертензивным, иммуномодулирующим, антибактериальным и противовирусным действием.

Антигипертензивные пептиды пищевого происхождения действуют главным образом путем ингибирования ангиотензин-1-превращающего фермента (АПФ) и, в меньшей степени, ингибируют активность ренинового фермента [6].

Пептиды могут являться перспективными материалами для иммуномодулирующих агентов при иммунодефиците [7].

Авторами разработаны проникающие в клетки пептиды, полученные из VDAC1, которые взаимодействуют с гексокиназой (HK), Bcl-2 и Bcl-xL, чтобы предотвратить антиапоптотическую активность этих белков и индуцировать гибель раковых клеток. Указанные пептиды продемонстрировали чувствительность панели генетически охарактеризованных линий раковых клеток, различающихся по происхождению и несущих мутации, к индуцированному пептидом апоптозу на основе VDAC1. Нераковые клеточные линии в меньшей степени подвергались воздействию пептидов. Авторы [8] синтезировали пептиды на основе VDAC1 с целью улучшения нацеливания, селективности и клеточной стабильности, включая R-Tf-D-LP4, содержащий последовательность интернализации рецептора трансферрина (Tf), которая позволяет нацеливать пептид на раковые клетки. Ученые утверждают, что пептиды на основе VDAC1 предлагают инновационную новую концептуальную основу для терапии рака [8].

Особое внимание заслуживают иммуномодуляторы на основе пептидов, выделенных из мясного сырья, тканей иммунокомпетентных органов животных и птицы, в частности, глюкозаминил-мурамилдипептид (ГМДП), зарегистрированный под названием, Ликопид® [9].

Определенный интерес среди иммуномодулирующих пептидов представляют пептиды, выделенные из иммуннокомпонентных органов животных и птиц. Иммуннокомпетентным органом у птицы является Фабрициуса (фабрициева сумка или бурса), в которой формируются плазматические клетки, синтезирующие антитела. Удаление бursy у птиц приводит к угнетению биосинтеза антител. Из бursy выделено 20 пептидов с иммуномодулирующими свойствами [10].

Бурсальные пептиды ингибируют рост раковых клеток, путем остановки клеточного цикла в фазе G1, т.е. не инициируется процесс образование центриолью материнской клетки новой структуры - первичной реснички, отходящей от поверхности клетки [11].

Цель работы – исследование физических характеристик белков, протеолитической активности экстракта фабрициевой сумки и его влияния на общую клеточность костного мозга и миелограмму иммунодефицитных мышей.

Материалы и методы исследования

Полученный на холоде экстракт фабрициевой сумки анализировали при помощи гель-хроматографии. Перед проведением анализа провели пробоподготовку: экстракт (гомогенат) очищали

от нерастворимых примесей в виде жира и мезги путем центрифугирования при температуре -5°C в течение 15 минут и скорости 11 000 об/мин. Надосадочную жидкость декантировали, пропуская через 4 слоя марли.

Полученный супернатант развели в 10 раз, после чего определяли концентрацию белка по методу Лоури с модификацией. По 0,5 мл раствора вносили на предварительно подготовленные хроматографические колонки с сефадексом G-75. Из колонки собрали по 20 фракций по 1 мл, для каждой фракции сняли показатель оптической плотности. По калибровочной прямой определили концентрации белков в разведении, затем – истинные концентрации белков.

Протеолитическую активность белков определяли в супернатанте, полученном в ходе экстракции на холоде.

Определение протеолитической активности проводили в разведениях в 10, 20, 50 и 100 раз следующим образом. В две пробирки – испытуемую и контрольную, вносили по 2 мл 1% раствора казеина, помещали их в водяную баню при температуре воды 30°C на 10 минут. По окончании выдержки в испытуемую пробирку вносили 0,5 мл разведенного супернатанта, а в контрольную – 0,5 мл воды очищенной. Содержимое пробирок перемешали стеклянной палочкой, поставили на повторную выдержку на 10 минут при той же температуре.

По истечении времени в обе пробирки добавили по 2,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты для прекращения действия ферментов, содержимое пробирок перемешали. Выделившийся осадок отфильтровали самотеком на плотной фильтровальной бумаге. Для полученного фильтрата измеряли оптическую плотность при длине волны $\lambda = 280$ нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Количество протеолитических единиц в 1 мл исследуемого раствора А (ПЕ/мл) рассчитывали по формуле:

$$A = (D_{\text{оп}} - D_{\text{к}}) \times P \times 2 \quad (1)$$

где $D_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытного раствора;

$D_{\text{к}}$ – оптическая плотность контрольного раствора;

P – разведение раствора;

2 – коэффициент пересчета протеолитической активности фермента на 1 мл исследуемого раствора.

Исследования проводили на мышах (самцы 3 месячного возраста по 5 мышей в каждой группе) линий СЗН, С57BL/6, С57BL/10, SJL. Все манипуляции с животными были осуществлены в соответствии с Директивой Совета ЕС 2010/63/EU и одобрены этическим комитетом научно-исследовательским институтом физиологии и иммунологии Уральского отделения Российской академии наук. Иммунодефицит у лабораторных мышей вызвали путем однократного внутрибрюшинного введения циклофосамида (ЦФА) (Эндоксан[®], Бакстер Онкология ГмбХ, Германия) в дозе 200 мг/кг массы тела животного в виде раствора со стерильным хлоридом натрия 0,9% в концентрации 20 мг/мл. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор хлорида натрия 0,9% в аналогичном объеме.

Смесь пептидов в виде ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров вводили на протяжении 7 дней с дня, следующего за инъекцией циклофосамида (ЦФА), внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл/20 мг массы животного. Контрольная группа мышей получала физиологический раствор хлорида натрия 0,9% в аналогичном объеме. Мыши выводились из эксперимента на 8 сутки после моделирования иммунодефицита под наркозом (за 15-20 минут до эвтаназии вводился 2 % Ксилазин (1 мл/кг) и Золетил-100 (0,3 мл/кг) внутримышечно). Затем проводился забор двух бедренных костей для определения клеточности костного мозга и подсчета миелограммы.

Для подсчета общего количества миелокариоцитов с помощью груши выдували костный мозг из бедренной кости в пробирку с 3%-ой уксусной кислотой ($V=4000$ мкл), подкрашенной метиленовым синим. Тщательно ресуспендировали костный мозг при помощи шприца с иглой, многократно набирая и выпуская взвесь через него. Далее набирали взвесь костного мозга в лейкоцитарный меланжер до отметки 0,5 и затем уксусную кислоту до отметки 11, дополнительно разводя таким образом взвесь в 20 раз. Содержимое меланжера заливали в камеру Горяева, предварительно спустив из меланжера чистую уксусную кислоту. Подсчет проводили в 20 больших квадратах.

Количество протеолитических единиц в 1 мл исследуемого раствора А (ПЕ/мл) рассчитывали по формуле:

$$K = n \times 20 \times 250 \times \left(\frac{4000}{20}\right) \quad (2)$$

где К – общее количество миелокариоцитов;

n – Количество клеток костного мозга в 1 бедренной кости мыши;

20 – разведение костного мозга;

250 – коэффициент пересчета (объем 1 большого квадрата 1/250);

4000 – множитель для перевода количества клеток из 1 мкл взвеси в объем 4000 мкл;

20 – количество просчитанных больших квадратов.

Кроме того, проводили дифференцировку миелокариоцитов в мазках костного мозга (около 500 миелокариоцитов в каждом препарате). Для получения мазка выдували с помощью груши костный мозг из бедренной кости в чашку Петри с каплей физиологического раствора. Пинцетом растирали костный мозг до гомогенной массы и делали мазок. Затем подсушенный мазок костного мозга мыши фиксировали этиловым спиртом и окрашивали красителем Романовского-Гимзы в течение 15 минут. Затем промывали мазки проточной водой и считали при увеличении 100× (с иммерсионным маслом) на световом микроскопе Leica DM 2500.

Представленные результаты показывают абсолютное количество миелокариоцитов костного мозга в миллионах на бедро по подтипам.

Анализ данных выполнен в пакете статистических программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001). Данные представлены в виде среднего арифметического (M) ± стандартная ошибка среднего (m). Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney Utest). При проверке статистических гипотез использовали 5% уровень значимости.

Результаты исследования

Результаты исследования протеолитической активности экстракта фабрициевой сумки цыплят-бройлеров представлены в таблице 1.

Таблица 1

Протеолитическая активность экстракта фабрициевой сумки цыплят-бройлеров

Разведение	Протеолитическая активность, ПЕ/мл
10	4,68
20	4,32
50	5,4
100	4,8
Среднее значение	4,8

Экстракт фабрициевой сумки цыплят-бройлеров обладает протеолитической активностью (4,68 ПЕ/мл), которая зависит от разведений. Так при 10 - кратном разведении составляет 4,68 ПЕ/мл, 20 -кратное - 4,32 ПЕ/мл.

Полученные данные позволяют предположить, что протеолитическая активность экстракта приводит к протеолизу белков и образованию пептидов, обладающих биологической активностью.

В таблице 2 представлены физические характеристики и молекулярная масса белков экстракта фабрициевой сумки при проведении гель-хроматографии на Sephadex G-75.

Физические характеристики и молекулярная масса белков экстракта фабрицевой сумки при проведении гель-хроматографии на Sephadex G-75

Объем, мл	Оптическая плотность, D ₇₅₀	Концентрация в разведении, мг/мл	Истинная концентрация, мг/мл	(V _i - V ₀) / V _k	Молекулярная масса белка, кДа
1	0,016	0,017	0,174	-0,153	-
2	0,008	0,009	0,087	0,000	-
3	0,291	0,318	3,177	0,153	88,744
4	0,221	0,242	2,416	0,306	-
5	0,090	0,098	0,979	0,459	-
6	0,102	0,111	1,110	0,612	-
7	0,185	0,202	2,024	0,765	-
8	0,215	0,235	2,350	0,917	13,964
9	0,135	0,148	1,480	1,070	-
10	0,074	0,081	0,805	1,223	-
11	0,048	0,052	0,522	1,376	-
12	0,056	0,061	0,609	1,529	3,181
13	0,008	0,009	0,087	1,682	-
14	0,016	0,017	0,174	1,835	-
15	0,010	0,011	0,109	1,988	-
16	0,006	0,007	0,065	2,141	-
17	0,010	0,011	0,109	2,294	-
18	0,006	0,007	0,065	2,446	-
19	0,004	0,004	0,044	2,599	-
20	0,010	0,011	0,109	2,752	-

Из данных таблицы 2 следует, что в экстракте фабрицевой сумки цыплят-бройлеров присутствуют пептиды с различной молекулярной массой. Так в 3 мл экстракта выделены пептиды с молекулярной массой 88,744 кДа, в 8 мл - 13,964 кДа и в 12 мл - 3,181 кДа. Полученные данные согласуются с исследованиями [12], в которых доказано, что образование биоактивных пептидов в животном сырье, содержащем белок может происходить за счет действия эндогенных протеолитических ферментов, обуславливающих протеолитическую активность.

В таблице 3 представлена миелограмма мышей различных линий с циклофосамид-индуцированным иммунодефицитом при 7-дневной терапии пептидами.

Проведенный анализ клеточности красного костного мозга свидетельствует, что после 7-дневного внутрибрюшинного введения пептидов отмечается достоверное увеличение ($p < 0,05$) общего числа миелокариоцитов у всех исследованных линий мышей с ЦФА-индуцированным иммунодефицитом. Так у мышей линии СЗН на 64,5%, С57BL/6 – 56,2%, С57BL/10 – 32,2% и SJL – 43,8%. Достоверное увеличение митозов в 5 раз отмечено у мышей линии СЗН.

Миелограмма мышей различных линий с циклофосфамид-индуцированным иммунодефицитом при 7-дневной терапии пептидами, (абсолютные значения, *10⁶/бедро)

Линия/Воздействие Тип клеток	СЗН		С57BL/6		С57BL/10		SJL	
	Физрас- твор	Пептиды	Физрас- твор	Пептиды	Физрас- твор	Пептиды	Физрас- твор	Пептиды
Эритробла- сты, *10 ⁶ /бедро	0,52±0,05	0,83±0,06*	0,60±0,03	0,80±0,05*	0,58±0,03	0,75±0,02*	0,67±0,25	0,69±0,03
Пронормо- бласт, *10 ⁶ /бедро	0,60±0,06	0,81±0,06*	0,62±0,02	0,84±0,02*	0,52±0,02	0,79±0,06*	0,43±0,03	0,65±0,03*
Базофильные нормобла- сты, *10 ⁶ /бедро	0,70±0,06	1,09±0,07*	0,76±0,10	1,49±0,05*	1,12±0,10	1,78±0,04*	1,45±0,10	1,90±0,12*
Полихроматофильные нормобласты, *10 ⁶ /бедро	1,29±0,08	2,04±0,08*	1,11±0,09	1,80±0,08*	1,66±0,07	2,37±0,12*	0,91±0,04	1,16±0,06*
Оксифильные нормо- бласты, *10 ⁶ /бедро	0,61±0,04	0,93±0,06*	0,88±0,10	1,24±0,07*	1,03±0,04	1,33±0,10	1,37±0,07	1,67±0,08*
Ретикулярные клетки, *10⁶/бедро	0,18±0,03	0,35±0,03*	0,28±0,01	0,47±0,03*	0,22±0,02	0,44±0,03*	0,16±0,02	0,27±0,02*
Нормоциты, *10 ⁶ /бедро	1,29±0,06	2,10±0,11*	1,49±0,14	2,51±0,07*	1,81±0,12	2,05±0,17	1,02±0,04	1,70±0,07*
Эритроидный ряд, *10⁶/бедро	5,03±0,26	7,82±0,19*	5,47±0,46	8,71±0,22*	6,73±0,31	9,10±0,33*	5,64±0,24	7,78±0,27*
Миелобла- сты, *10 ⁶ /бедро	0,44±0,03	0,80±0,05*	0,53±0,02	0,74±0,04*	0,54±0,02	0,81±0,04*	0,40±0,02	0,64±0,04*
Промиело- циты, *10 ⁶ /бедро	0,48±0,04	0,77±0,04*	0,56±0,03	0,83±0,03*	0,56±0,04	0,76±0,02*	0,45±0,02	0,67±0,03*
Миелоциты, *10 ⁶ /бедро	0,61±0,05	1,01±0,05*	0,64±0,03	0,86±0,05*	0,85±0,04	0,80±0,04	0,47±0,03	0,75±0,06*
Метамиело- циты, *10 ⁶ /бедро	0,58±0,05	1,03±0,07*	0,91±0,05	1,35±0,05*	1,13±0,11	1,30±0,07	0,69±0,05	0,99±0,05*
Нейтрофилы юные, *10 ⁶ /бедро	1,49±0,07	2,84±0,18*	1,32±0,13	2,29±0,08*	1,64±0,08	2,41±0,10*	1,30±0,03	1,98±0,12*
Нейтрофилы палочко- ядерные, *10 ⁶ /бедро	2,74±0,18	4,36±0,25*	4,64±0,25	6,57±0,11*	4,34±0,24	6,01±0,31*	3,27±0,16	4,68±0,21*
Нейтрофилы сегменто- ядерные, *10 ⁶ /бедро	5,28±0,28	9,47±0,24	5,15±0,26	7,35±0,19*	5,15±0,32	6,89±0,22*	3,99±0,18	5,72±0,27*
Нейтрофильный ряд, *10⁶/бедро	11,63±0,49	20,30±0,42*	13,82±0,71	20,00±0,43*	14,22±0,82	19,09±0,78*	10,60±0,45	15,46±0,73*
Базофильный ряд, *10⁶/бедро	0,31±0,05	0,57±0,06*	0,53±0,04	0,66±0,03*	0,46±0,01	0,72±0,02*	0,39±0,02	0,64±0,04*
Эозинофильный ряд, *10⁶/бедро	0,07±0,02	0,07±0,02	0,08±0,02	0,10±0,02	0,04±0,01	0,72±0,02*	0,05±0,02	0,10±0,03
Моноциты, *10 ⁶ /бедро	0,94±0,10	1,57±0,10*	1,00±0,07	1,53±0,06*	1,04±0,07	1,28±0,05*	0,96±0,03	1,45±0,11*
Макрофаги, *10 ⁶ /бедро	1,13±0,09	1,66±0,09*	1,16±0,07	1,58±0,05*	1,18±0,05	1,60±0,06*	1,04±0,04	1,40±0,07*
Моноцитарный ряд, *10⁶/бедро	2,07±0,19	3,24±0,18*	2,17±0,14	3,11±0,10*	2,22±0,12	2,88±0,10*	1,99±0,08	2,85±0,17*
Лимфобла- сты, *10 ⁶ /бедро	1,14±0,05	1,59±0,06*	0,99±0,07	1,55±0,04*	0,91±0,09	1,41±0,03*	0,91±0,06	1,25±0,04*
Лимфоциты, *10 ⁶ /бедро	1,27±0,11	1,79±0,08*	1,16±0,06	1,69±0,05*	1,28±0,07	1,52±0,07*	1,03±0,06	1,52±0,07*
Плазмоциты, *10 ⁶ /бедро	0,19±0,01	0,30±0,03*	0,26±0,03	0,32±0,03	0,18±0,03	0,22±0,02	0,18±0,02	0,24±0,03
Лимфоидный ряд, *10⁶/бедро	2,62±0,13	3,68±0,08*	2,42±0,15	3,58±0,08*	2,38±0,16	3,15±0,09*	2,13±0,13	3,02±0,13*
Мегакариоцитарный ряд, *10⁶/бедро	0,05±0,01	0,09±0,02	0,04±0,01	0,06±0,01	0,03±0,01	0,07±0,02*	0,03±0,01	0,04±0,01
Митозы, *10 ⁶ /бедро	0,01±0,01	0,05±0,01	0,01±0,01	0,11±0,04	0,05±0,02	0,07±0,02	0,02±0,01	0,03±0,02
Всего, *10⁶/бедро	22,01±1,01	36,20±0,73*	24,74±1,46	36,83±0,77*	26,37±1,38	35,65±1,18*	21,03±0,91	30,25±1,31*

* - различия с контролем достоверны (p < 0,05)

Что касается отдельных типов миелокариоцитов, то у мышей линии СЗН значимо по сравнению с контролем увеличивается абсолютное количество всех оцениваемых подтипов клеток, кроме сегментоядерных нейтрофилов, клеток эозинофильного и мегакариоцитарного ростка. У мышей линии С57BL/6 7-дневный курс пептидов также вызывает существенное повышение количества миелокариоцитов всех ростков и стадий дифференцировки кроме эозинофильного и мегакариоцитарного ростка. Так клетки лимфоидного ростка увеличились на фоне введения пептидов иммунодефицитным мышам линии СЗН на 40,5%, С57BL/6 – 48,0%, С57BL/10 – 32,4% и SJL – 41,8%, количество

клеток моноцитарного ростка возросло у мышей линии СЗН на 56,2%, С57BL/6 – 43,3%, С57BL/10 – 29,8% и SJL – 43,2%, базофильный ряд увеличился у мышей линии СЗН на 83,8%, С57BL/6 – 24,5%, С57BL/10 – 56,5% и SJL – 64,1%, нейтрофильный ряд у мышей линии СЗН на 74,6%, С57BL/6 – 44,7%, С57BL/10 – 34,24% и SJL – 45,9%, эритроидный ряд у мышей линии СЗН на 55,5%, С57BL/6 – 59,2%, С57BL/10 – 35,22% и SJL – 37,9%, количество ретикулярных клеток у мышей линии СЗН на 43,8%, С57BL/6 – 67,9%, С57BL/10 – 200,0% и SJL – 68,9%.

У мышей линии С57BL/10 терапия пептидами вызывает увеличение количества эритробластов, пронормоцитов, базофильных и полихроматофильных нормобластов, ретикулоцитов, миелобластов и промиелоцитов, юных, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, клеток базофильного и эозинофильного рядов, моноцитов и макрофагов, лимфобластов и лимфоцитов, клеток мегакариоцитарного ростка.

Полученные данные согласуются с исследованиями [13], в которых показано, что пептиды проявляют различную биологическую активность, например, пептиды «Heteractis crispa Kunitz» значительно повышают кроветворение, жизнеспособность клеток нейробластомы в модели нейротоксичности, индуцированной 6-ОНДА *in vitro*, что является следствием эффективного снижения уровня АФК в клетках.

Выводы

Установлена протеолитическая активность экстракта фабрициевой сумки цыплят бройлеров, что обуславливает в результате протеолиза образование в нем биологически активных пептидов с различной молекулярной массой. Оценка клеточного состава миелокариоцитов красного костного мозга мышей линии SJL с ЦФА-индуцированным иммунодефицитом на фоне 7-дневной терапии пептидами свидетельствует о значимом повышении содержания клеток практически всех ростков кроветворения, исключение составляют эритробласты, клетки эозинофильного и мегакариоцитарного ростков, плазмоциты.

Таким образом, в ответ на введение пептидов отмечается значительная активация продукции и созревания эритроцитарного, нейтрофильного, базофильного, моноцитарного и лимфоцитарного ростков. Эозинофильный и мегакариоцитарный ростки реагируют не так активно, значимый рост числа их клеток наблюдается только у мышей линии С57BL/10.

Можно предположить, что воздействие пептидов у разных линий мышей в исследуемые сроки больше касается влияния на деление и дифференцировку предшественников эритроцитов, нейтрофилов, базофилов, моноцитов и в меньшей степени лимфоцитов, чем на выход зрелых клеток в периферическую кровь. При этом также прослеживаются и линейные особенности реакции миелокариоцитов на пептиды. Следует отметить, что разные линии мышей характеризуются различной чувствительностью к ЦФА, их восприимчивость и быстрота компенсаторного ответа на алкилирующее ДНК и белки действие ЦФА различается. Линия С57BL/6 относится к слабо-реагирующим на действие ЦФА, а мыши линии СЗН показывают ответ средней выраженности.

Также известно, что ЦФА значительно сильнее угнетает лимфопоз в костном мозгу крыс по сравнению с эритропозом. Однако следует учитывать, что при создании нутрицевтиков и функциональных продуктов питания с биологически активными пептидами пищевого происхождения, что пептиды обладают внутренними недостатками, включая плохую химическую и физическую стабильность и короткий период полураспада в циркулирующей плазме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chakrabarti S., Guha S., Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities // *Nutrients*. – 2018. – V. 10. – №. 11. – P. 1738.
2. Sable R., Parajuli P., Jois S. Peptides, peptidomimetics, and polypeptides from marine sources: A wealth of natural sources for pharmaceutical applications // *Marine drugs*. – 2017. – V. 15. – №. 4. – P. 124.
3. Hall F., Reddivari L., Liceaga A. M. Identification and characterization of edible cricket peptides on hypertensive and glycemic *in vitro* inhibition and their anti-inflammatory activity on RAW 264.7 macrophage cells // *Nutrients*. – 2020. – V. 12. – №. 11. – P. 3588.

4. Mezenova N. Y. et al. Obtaining and estimating the potential of protein nutraceuticals from highly mineralized collagen-containing beef raw materials // Теория и практика переработки мяса. – 2021. – V. 6. – №. 1. – P. 10-22.
5. Chernukha I. M. et al. Biologically active peptides of meat and meat product proteins: a review. Part 1. General information about biologically active peptides of meat and meat products // Theory and Practice of Meat Processing. – 2019. – V. 4. – №. 4. – P. 12-16.
6. Manzanares P. et al. Improving health-promoting effects of food-derived bioactive peptides through rational design and oral delivery strategies // Nutrients. – 2019. – V. 11. – №. 10. – P. 2545.
7. Furukawa N., Popel A. S. Peptides that immunoactivate the tumor microenvironment // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. – 2021. – V. 1875. – №. 1. – P. 188486.
8. Shteinfer-Kuzmine A. et al. Selective induction of cancer cell death by VDAC 1-based peptides and their potential use in cancer therapy // Molecular oncology. – 2018. – V. 12. – №. 7. – P. 1077-1103.
9. Пинегин Б. В., Хаитов Р. М. Современные принципы создания иммуотропных лекарственных препаратов // Иммунология. – 2019. – Т. 40. – №. 6. – С. 57-62.
10. Lacroix I. M. E. et al. Investigation into the bioavailability of milk protein-derived peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity using Caco-2 cell monolayers // Food & Function. – 2017. – V. 8. – №. 2. – P. 701-709.
11. Li J. et al. Bursopentin (BP5) induces G1 phase cell cycle arrest and endoplasmic reticulum stress/mitochondria-mediated caspase-dependent apoptosis in human colon cancer HCT116 cells // Cancer cell international. – 2019. – V. 19. – №. 1. – P. 1-13.
12. Mora L., Gallego M., Toldrá F. ACEI-inhibitory peptides naturally generated in meat and meat products and their health relevance // Nutrients. – 2018. – V. 10. – №. 9. – P. 1259.
13. Kvetkina A. et al. A new multigene HClQ subfamily from the sea anemone *Heteractis crispata* encodes Kunitz-peptides exhibiting neuroprotective activity against 6-hydroxydopamine // Scientific reports. – 2020. – V. 10. – №. 1. – P. 1-14.

THE EFFECT OF ANIMAL PEPTIDES ON THE OVERALL BONE MARROW CELLULARITY AND MYELOGRAM OF IMMUNODEFICIENT MICE

¹Tikhonov Sergey Leonidovich, Dr Sci. (Engineering), Head of Department of Food Engineering

²Kolberg Nataliya Aleksandrovna, Cand. Sci. (Veterinary), Docent of Department of Food Engineering

³Tikhonova Natalya Valerevna, Dr Sci. (Engineering), Professor of Department of Food Engineering

⁴Lazarev Vladimir Alexandrovich, Cand. Sci. (Engineering), Docent of Department of Food Engineering

^{1,2,3,4}Ural State Economic University, Yekaterinburg, Russia, e-mail: ¹tihonov75@bk.ru

The work is devoted to the study of the physical characteristics of proteins, the proteolytic activity of fabricium bag extract and its effect on the overall bone marrow cellularity and myelogram of immunodeficient mice. The extract of the fabricium bag obtained in the cold was analyzed using gel chromatography. The protein concentration in the extract was determined by the Lowry method with modification. The studies were carried out on mice (males of 3 months of age, 5 mice in each group) of the lines C3H, C57BL/6, C57BL/10, SJL. It was found that the proteolytic activity of the extract of the fabricium bag of broiler chickens depends on 4.68 PE/ml at 10-fold dilution. It is proved that peptides with different molecular weights are present in the extract of the fabricium bag of broiler chickens. Peptides with a molecular weight of 88.744 kDa were isolated in 3 ml of the extract, 13.964 kDa in 8 ml and 3.181 kDa in 12 ml. Evaluation of the cellular composition of red bone marrow myelocaryocytes of SJL mice with CFA-induced immunodeficiency against the background of 7-day therapy with peptides of fabricium bag extract testifies to a significant increase in the cell content of almost all hematopoietic sprouts, the exception being eryth-

roblasts, cells of eosinophilic and megakaryocytic sprouts, plasmocytes. After 7-day intraperitoneal administration of peptides, there was a significant increase in the total number of myelocaryocytes in all studied lines of mice with CFA-induced immunodeficiency. In mice of the C3H line by 64.5 %, C57BL/6 – 56.2 %, C57BL/10 – 32.2 % and SJL - 43.8 %. A significant 5-fold increase in mitosis was observed in C3H mice. In response to the introduction of peptides, there is a significant activation of the production and maturation of erythrocytic, neutrophilic, basophilic, monocytic and lymphocytic sprouts. Eosinophilic and megakaryocytic sprouts do not react as actively, a significant increase in the number of their cells is observed only in mice of the C57BL/10 line.

УДК 637.146

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ РЕЦЕПТУРЫ КИСЛОМОЛОЧНОГО МОРОЖЕНОГО БЕЗ САХАРА, ОБОГАЩЕННОГО ПРЕБИОТИКАМИ

¹Федоренко Дарья Дмитриевна, магистрант

²Агафонова Светлана Викторовна, канд. техн. наук, доцент кафедры пищевой биотехнологии

^{1,2}ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия, e-mail: ¹darya.fedorenko@klgtu.ru; ²svetlana.agafonova@klgtu.ru

С помощью маркетинговых исследований была обоснована актуальность разработки нового вида кисломолочного мороженого с сахарозаменителем и пребиотиками лактулозой и инулином. Проводился мониторинг влияния лактулозы и инулина на структурно-механические свойства кисломолочного мороженого, используя математическое моделирование, определено их оптимальное количество для введения в мороженое (1,55 кг и 1,65 кг на 100 кг готовой продукции соответственно). Установлен химический состав готового продукта, его органолептические и физико-химические показатели качества.

Введение

Кисломолочное мороженое представляет собой продукт, содержащий живую микрофлору, предназначенный для длительного хранения. Такой продукт может использоваться для улучшения здоровья человека, поскольку молочнокислая микрофлора в его составе благоприятным образом сказывается на функционировании желудочно-кишечного тракта [1]. Для поддержания нормальной микрофлоры кишечника необходимо употреблять продукты, которые содержат в своем составе определенные полезные живые микроорганизмы [2].

Обогащение кисломолочного мороженого пребиотиками, такими как инулин и лактулоза, а также замена сахара на подсластитель эритрит, способствует восполнению необходимых дефицитных компонентов питания среди населения, повышению биологической ценности готового мороженого и расширению ассортимента замороженных десертов [3].

Инулин - растительный полисахарид и пребиотик, обладающий высокой растворимостью и рядом положительных свойств, влияющих на работу желудочно-кишечного тракта. Данный полисахарид не повышает уровень глюкозы в крови, содержит в себе пищевые волокна и может употребляться людьми с повышенным содержанием сахара в крови, а также страдающими сахарным диабетом. Благодаря инулину активно развивается собственная полезная микрофлора кишечника и подавляется деятельность патогенных бактерий. Более того, инулин нейтрализует негативное влияние на здоровье человека различных токсичных ксенобиотиков [4].

Лактулоза является дисахаридом и изомеров лактозы, который включает в себя молекулу и фруктозы, и галактозы. Данный дисахарид при различных условиях окружающей среды способен

сохранять все свои полезные свойства, т.е. обладает функциональной стабильностью. Лактулоза обладает антиканцерогенным эффектом и способствует укреплению общего иммунитета [5].

Лактулозу и инулин широко используют в технологии кисломолочных продуктов для придания им функциональных свойств. Данные добавки имеют положительное влияние на качество готовых продуктов. При низкотемпературной обработке и длительном хранении увеличивается выживаемость заквасочной микрофлоры, консистенция становится более однородной, а также увеличиваются сроки хранения уже готового продукта [6].

Среди различных сахарозаменителей особый интерес для использования в технологии кисломолочного мороженого представляет эритрит – простейший четырёхатомный спирт. Его получают из различного углеводсодержащего сырья с помощью ферментативного биосинтеза. Эритрит обладает высокой стабильностью в щелочных и кислотных средах, имеет достаточно высокую температуру плавления. Эритрит представляет интерес с точки зрения внесения в кисломолочное мороженое благодаря своим вкусоароматическим характеристикам: он усиливает сладкий вкус, улучшает текстуру продукта и маскирует неприятные оттенки вкуса [7].

Внесение выбранных пребиотиков и подсластителя даст возможность создать новые виды кисломолочной продукции с учётом всех потребностей и предпочтений потребителей.

Объекты исследования

Для исследований были изготовлены образцы кисломолочного мороженого с различными дозировками пребиотиков инулина и лактулозы. Для выработки образцов использовали следующее сырьё и материалы: пастеризованное коровье молоко жирностью 2,5 %, пастеризованные коровьи сливки жирностью 33 %, сухое молоко жирностью 1,5 %, закваску молочнокислых микроорганизмов, пребиотики лактулозу (сироп) и инулин (порошок), сахарозаменитель эритрит.

Для сквашивания была подобрана закваска молочнокислых микроорганизмов, состав которой представлен в таблице 1. Выбор закваски обусловлен наиболее благоприятными органолептическими свойствами получаемого продукта [8].

Таблица 1

Состав используемой закваски молочнокислых микроорганизмов

<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>

Цель и задачи исследования

Целью исследовательской работы явилось совершенствование технологии кисломолочного мороженого без сахара, обогащенного пребиотиками.

Для достижения поставленной цели решались задачи по подтверждению актуальности разработки нового кисломолочного продукта для потребителей, проживающих на территории Калининградской области, совершенствованию рецептуры кисломолочного мороженого с использованием метода математического моделирования, определению структурно-механических свойств и установлению показателей качества готового мороженого.

Методы исследования

В процессе приготовления смеси для мороженого с использованием выбранной закваски молочнокислых микроорганизмов проводился мониторинг нарастания кислотности титриметрическим методом.

При моделировании и оптимизации рецептуры обогащенного кисломолочного мороженого

были установлены оптимальные дозировки вносимых пребиотиков. Изучали влияние двух факторов на структурно-механические свойства мороженого. Ими являлось содержание инулина, которое варьировалось от 5 г до 15 г (верхний уровень) и содержание лактулозы, которое варьировалось от 2 г до 10 г (верхний уровень). Данные дозировки были выбраны, исходя из загрузки лабораторного фризера.

Качество готового мороженого оценивалось по трем показателям: твердость (г), взбитость (%) и органолептическая оценка (балл). Совокупность данных показателей дает возможность получить более гармоничную композицию разрабатываемого продукта.

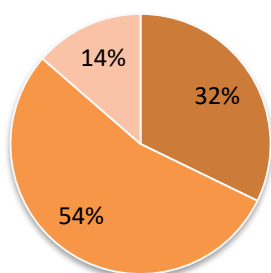
Органолептические показатели устанавливались с помощью специально разработанной 15-балльной шкалой, учитывая коэффициенты значимости каждой характеристики качества. Органолептическая оценка готового кисломолочного мороженого проводилась по цвету, запаху, внешнему виду, консистенции, структуре и вкусу. Определение структурно-механических свойств проводилось с использованием текстурного анализатора BROOKFIELD CT3.

Кислотность готового мороженого устанавливалась титриметрическим методом по ГОСТ Р 54669-2011. Содержание влаги и сухих веществ определялось путем высушивания навески в сушильном шкафу по ГОСТ Р 54668. Массовую долю белка измеряли по методу Кьельдаля по ГОСТ 23327. Содержания сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО) устанавливалось расчетным путем по ГОСТ 54761. Взбитость мороженого после фризирования определяли согласно ГОСТ 32929. Массовую долю жира определяли, как разность между навесками мороженого до и после экстрагирования диэтиловым эфиром в аппарате Сокслета. Для определения количества золы в продукте навеску сжигали при температуре 650-700 °С.

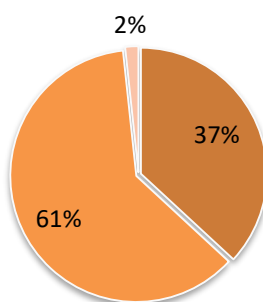
Результаты исследования

Опрос жителей Калининградской области показал актуальность разработки рецептуры кисломолочного мороженого, обогащенного пребиотиками. Установлено, что почти половина респондентов имеют проблемы с работой органов желудочно-кишечного тракта. Основная часть потребителей знает о полезных свойствах пре- и пробиотиков. Подавляющая часть опрошенных положительно относятся к новому кисломолочному мороженому и хотели бы попробовать данный продукт. Более подробно результаты маркетинговых исследований представлены на рисунке 2.

Страдаете ли Вы заболеваниями органов желудочно-кишечного тракта?



Знаете ли вы о том, какую пользу приносит потребление пре- и пробиотиков желудочно-кишечному тракту?



Хотели бы попробовать йогуртное мороженое с пребиотиками и без сахара?

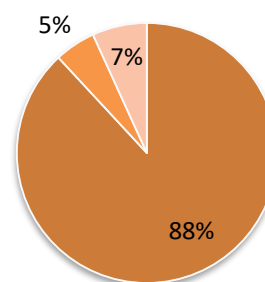


Рис. 1. Результаты маркетинговых исследований

Исходя из полученных данных была построена кривая нарастания кислотности относительно продолжительности сквашивания, которая представлена на рисунке 1. Экспериментальным путем была выявлена оптимальная продолжительность сквашивания, исходя из необходимой кислотности (85 °Т), которая составляет 6 часов.

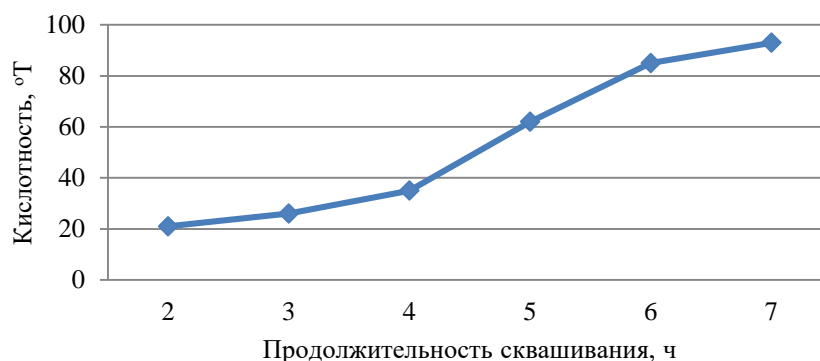


Рис. 2. График нарастания кислотности в процессе сквашивания

План эксперимента по оптимизации рецептуры обогащенного кисломолочного мороженого и результаты его реализации представлены в таблице 2.

Таблица 2

План эксперимента по моделированию и оптимизации по рецептуре кисломолочного мороженого с добавлением инулина и лактулозы и результаты его реализации

№ опыта	План эксперимента		Частные отклики			Частные безразмерные отклики			Обобщенный параметр оптимизации, у
	Ми, г	Мл, г	О, баллы	В, %	Т, г	S _о ²	S _в ²	S _т ²	
1	15	10	13,2	33	5478	0,0144	0,1156	7,0331	7,1631
2	5	10	14,5	45	1622	0,0011	0,01	0,0066	0,0177
3	15	2	12,9	33	4143	0,0196	0,1156	3,1046	3,2398
4	5	2	13,9	32	5420	0,0054	0,1296	6,8295	6,9645
5	15	6	13,1	39	4002	0,0160	0,0484	2,7822	2,8466
6	5	6	14,7	48	1130	0,0004	0,0016	0,0608	0,0628
7	10	10	14,0	55	2218	0,0044	0,01	0,2291	0,2435
8	10	2	13,8	30	3315	0,0054	0,16	1,4641	1,6295
9	10	6	14,9	51	1516	0,00004	0,0004	0,0001	0,0005

Преобразование представленных выше данных позволили получить кодированную математическую модель рецептуры кисломолочного мороженого, обогащенного инулином и лактулозой:

$$y = 2,4631 + 1,0341 * x_1 - 0,7349 * x_2 + 2,7215 * x_1 * x_2 + 2,7579 * x_1^2 + 2,2399 * x_2^2 \quad (1)$$

где у – параметр оптимизации;
 x_1 – содержание инулина,
 x_2 – содержание лактулозы.

Дальнейшие математические преобразования полученной модели позволили перейти к натуральному выражению рецептуры:

$$y = 21,2955 - 2,8158 * Ми - 3,2235 * Мл + 0,1361 * Ми * Мл + 0,1103 * Ми^2 + 0,1399 * Мл^2 \quad (2)$$

где у – параметр оптимизации.
Ми – содержание инулина, г;
Мл – содержание лактулозы, г.

В результате расчетов были установлены оптимальные дозировки лактулозы и инулина: 7,6 и 8,1 г на одну загрузку лабораторного фризера (490 г) соответственно, что наглядно представлено на рисунке 3.

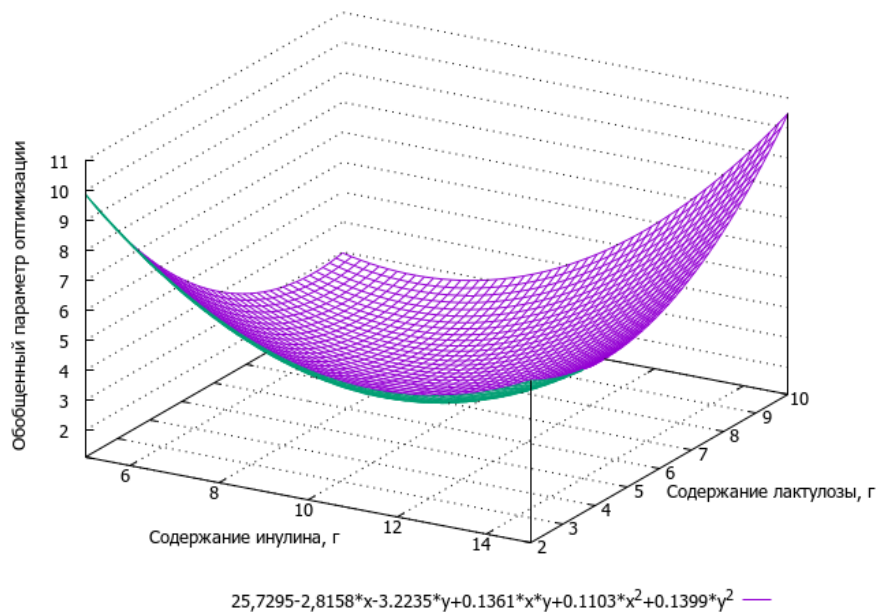


Рис. 3. Графическая модель рецептуры обогащенного кисломолочного мороженого

Оптимальные дозировки лактулозы и инулина в пересчете на 100 кг готового мороженого составят 1,55 кг и 1,65 кг соответственно.

Необходимостью при производстве качественного замороженного кисломолочного десерта является получение правильной консистенции и улучшение структурно-механических свойств готового продукта. Эти показатели обеспечиваются за счет добавления оптимального количества инулина и лактулозы. На рисунке 4 представлены кривые деформации образцов мороженого с различными концентрациями инулина и лактулозы. По оси ординат расположены значения нагрузки (г), которая прикладывается к образцу. Таким образом по кривым определяли твердость образца мороженого как максимальную испытываемую им нагрузку.

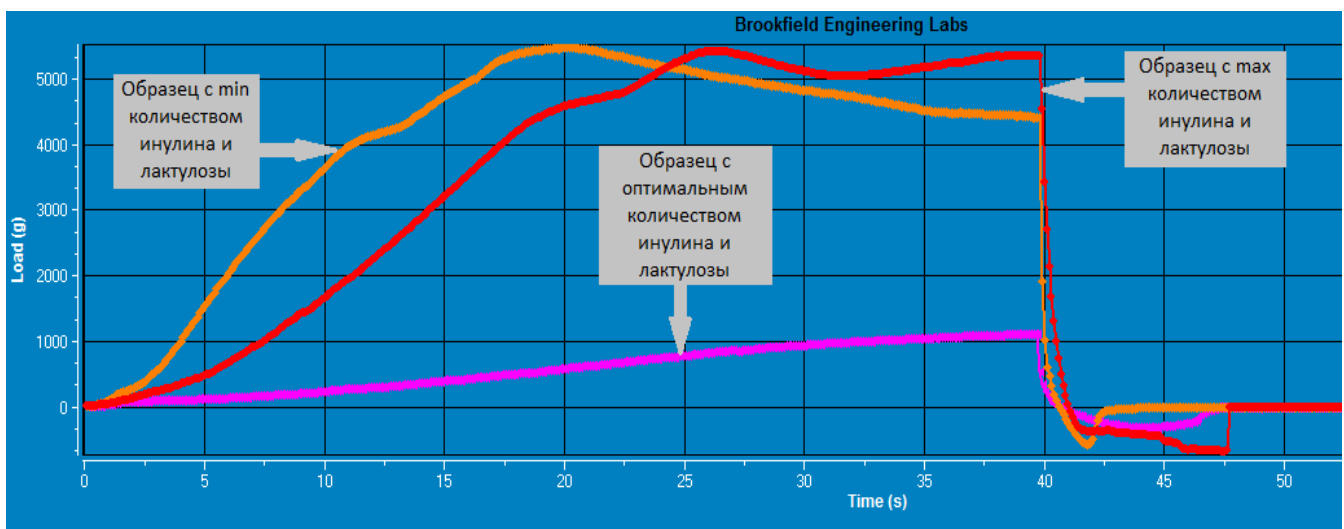


Рис. 4. Кривые деформации образцов кисломолочного мороженого

При внесении установленных опытным путем дозировок лактулозы и инулина улучшается взбитость и мягкость готового продукта. При внесении избыточного или недостаточного количества данных добавок образцы становятся более твердыми, что выражается в неблагоприятной органолептической оценке. При увеличении дозировки инулина была отмечена крошливость консистенции.

Кисломолочное мороженое с пониженным гликемическим индексом, обогащенное пребиотиками, является функциональным, так как при систематическом употреблении 150 г он удовлетворяет суточную потребность организма: в пищевых волокнах на 16% (от адекватного уровня потребления), лактулозы на 90% (от адекватного уровня потребления), что выше 15%, требуемых ГОСТ Р 54059-2010. По содержанию инулина 150 г мороженого с избытком покрывает дневную потребность человека, при этом не превышая верхний допустимый уровень потребления [9].

По органолептическим и физико-химическим показателям кисломолочное мороженое, обогащенное пребиотиками, должно соответствовать требованиям разработанных Технических условий и ГОСТ 32929-2014 "Мороженое кисломолочное. Технические условия", указанным в таблицах 3, 4 и 5.

Расчетным путем была установлена калорийность 100 г готового мороженого, которая составила 165 ккал (690,4 кДж).

Таблица 3

Органолептические показатели обогащенного кисломолочного мороженого

Наименование показателя	Характеристика
Внешний вид	Порции, обусловленной геометрией формирующего устройства или потребительской упаковки, без глазури (шоколада).
Вкус и запах	Чистый кисло-сладкий, характерный для кисломолочных продуктов со вкусом и ароматом ванили. Посторонние привкус и запах не допускаются
Структура	Однородная, с органолептически неощутимыми кристаллами льда, без ощутимых комочков стабилизатора и эмульгатора.
Консистенция	Плотная
Цвет	Равномерный по всей массе светло-бежевый цвет, соответствующий цвету используемого сырья.

Таблица 4

Общий химический состав готовой продукции

Наименование показателя	Полученные значения	Нормативные значения
Влага, %	67	не нормируется
Сухие вещества, %	33,0	29,0-33,0
Белок, %	7,2	не нормируется
Жир, %	7,4	0,5-7,5
Минеральные вещества, %	1,0	не нормируется
Массовая доля углеводов*, %	17,4	не нормируется

*данные получены расчетным путем

Таблица 5

Физико-химические показатели готовой продукции

Наименование показателя	Полученные значения	Нормативные значения
Кислотность, °Т	78	не более 90
Взбитость, %	51	30-90
СОМО*, %	9,1	8,5-9-5

*данные получены расчетным путем

Заключение

Новое кисломолочное мороженое с лактулозой, инулином и сахарозаменителем может быть рекомендовано детям начиная с дошкольного возраста и всем категориям взрослого населения, в

качестве источника полноценного белка, молочного жира, пищевых волокон и пробиотиков. Особый интерес данный продукт представляет для группы населения, имеющих нарушения в работе органов желудочно-кишечного тракта и повышенным содержанием сахара в крови.

В результате исследовательской работы были обозначены следующие выводы:

1. Результаты опроса в рамках маркетинговых исследований дают понять, что население Калининградской области заинтересовано в потреблении кисломолочного мороженого с сахарозаменителем и обогащенного инулином и лактулозой. Данный факт подтверждает актуальность и целесообразность производства такого нового продукта.

2. Установлены оптимальные дозировки вносимых в кисломолочное мороженое лактулозы (Мл = 1,55 кг на 100 кг готовой продукции) и инулина (Ми = 1,65 кг на 100 кг готовой продукции). Впоследствии было изучено их влияние на структурно-механические и органолептические показатели готового продукта.

3. Проанализированы реологические свойства (твердость и взбитость) нового обогащенного кисломолочного мороженого, которые зависят от точно определенного оптимального содержания лактулозы и инулина. Установлены органолептические, физико-химические показатели и химический состав обогащенного кисломолочного мороженого. Полученные данные соответствуют разработанным Техническим условиям и ГОСТ 32929-2014 "Мороженое кисломолочное. Технические условия".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Творогова, А. Кисломолочное мороженое / А. Творогова, Е.Р. Жаркова, Н.В. Казакова, Е.А. Крюковский // Империя холода. - 2015. - №3(72). - С. 71-74.

2. Рябцева, С. А. Мороженое как средство доставки *Lactobacillus acidophilus* / С.А. Рябцева, В. Р. Ахмедова, Г. С. Анисимов // Техника и технология пищевых производств. - 2018. - №2. - С. 5-27.

3. Ахмедова, В. Р. Научное обоснование способа получения кисломолочного мороженого с пребиотическими компонентами / С. А. Рябцева, М. А. Шпак, Г. С. Анисимов // Техника и технология пищевых производств. - 2015. - № 4. - С. 5-13.

4. Сербяева, Э.Р. Инулин: природные источники, особенности метаболизма в растениях и практическое применение / Э. Р. Сербяева, А. Б. Якупова, Ю. Р. Магасумова // Биомика. - 2020. - Т.12(1). - С. 57-79.

5. Леонидов, Д. С. Лактулоза: диапазон использования в пищевой промышленности / Д. С. Леонидов // Пиво и напитки. - 2011. - №6. - С. 26-27.

6. Богданова Е.В. Кисломолочное мороженое с пребиотическими свойствами / Е.В. Богданова, Е.И. Мельникова, Р.О. Будкевич, А.В. Литвинова // Вестник Международной академии холода. - 2018. - № 4. - С. 15–21.

7. Покхрел, П. Р. Эритрит – заменитель сахара нового поколения [Электронный ресурс] / П. Р. Покхрел // Российская диабетическая газета [Официальный сайт]. Режим доступа: <http://www.diabetes.ru/org/ru/news/rda-news/eritrit-zamenitel-sahara>

8. Федоренко, Д.Д. Оптимизация рецептуры кисломолочного мороженого с пониженным гликемическим индексом / Д.Д. Федоренко, С.В. Агафонова // Вестник молодежной науки: сетевое издание КГТУ [Электронный ресурс]. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2022. – №3(35). Режим доступа: <http://vestnikmolnauki.ru/wp-content/uploads/2022/08/Statya-1-Fedorenko-D-.pdf>

9. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продуктам (товарам), подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю).- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.- 707 с.

OPTIMIZATION OF THE SOUR MILK ICE CREAM FOR LUMA WITH LOW GLICEMIC INDEX

¹Fedorenko Daria Dmitrievna, student

²Agafonova Svetlana Viktorovna, PhD, Associate Professor of Food Biotechnology

^{1,2}Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia,

e-mail: ¹darya.fedorenko@klgtu.ru; ²svetlana.agafonova@klgtu.ru

With the help of marketing research, the urgency of developing a new type of fermented milk ice cream with sweetener and prebiotics lactulose and inulin was substantiated. The influence of lactulose and inulin on the structural and mechanical properties of fermented milk ice cream was monitored, using mathematical modeling, their optimal amount for introduction into ice cream was determined (1.55 kg and 1.65 kg per 100 kg of finished products, respectively). The chemical composition of the finished product, its organoleptic and physico-chemical quality indicators have been established.

УДК 664.955: 664.959

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА ИКОРНОЙ ПРОДУКЦИИ ИЗ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ КАК РЕЦЕПТУРНОГО ИНГРЕДИЕНТА ЭМУЛЬСИОННЫХ ПРОДУКТОВ

¹Чмыхалова Виктория Борисовна, канд. биол. наук, доцент, заведующая кафедрой «Технологии пищевых производств»

²Ефимова Марина Васильевна, канд. биол. наук, доцент

³Ефимов Андрей Анатольевич, канд. техн. наук, доцент

^{1,2,3}ФГБОУ ВО «Камчатский государственный технический университет», Петропавловск-Камчатский, Россия, e-mail: ¹chmykhalovav@mail.ru

Икра лососевых рыб богата белками, липидами, витаминами и минеральными веществами. Особенностью икры является эмульгирующая способность, обусловленная наличием в составе лецитина. Традиционная технология зернистой икры лососевых рыб предполагает образование отходов производства, состоящих из оболочки ястыка, перезрелой и недозрелой икры. Проведены работы по обоснованию технологии майонезов с добавлением доброкачественных отходов икорного производства. Внесение икорных отходов в состав майонезов поддерживает стабильность эмульсии, обеспечивает хорошие органолептические показатели готовой продукции.

Введение

Производство продуктов из гидробионтов является для Камчатского края одним из основных направлений развития пищевой отрасли. Наиболее ценными объектами переработки на Камчатке традиционно считаются тихоокеанские лососевые рыбы. Икра лососевых – уникальное сырьё, в котором в оптимальных количествах сочетаются белки, липиды, витамины и другие биологически ценные вещества.

При реализации продукции из тихоокеанских лососевых рыб более половины дохода приносит реализация икорных продуктов. Современные технологии переработки икры весьма разнообразны. Наиболее часто рыбперерабатывающие предприятия применяют классическую, типовую технологию зернистой икры, которая включает сортирование, пробивку ястыков для отделения

зерна от соединительной ткани, посол пробитой икры, обезвоживание в центрифугах, инспектирование, фасование и товарное оформление. Технологические операции, осуществляемые механически (пробивка, центрифугирование), приводят к повреждению икринок и значительным потерям ценного сырья. В результате обработки появляется некоторое количество икорных отходов (ИО), в том числе недозревшей и перезревшей икры, отделяемой при сортировании, которые не используются при выпуске пищевой и кормовой продукции. Высокая пищевая ценность ИО позволяет рассматривать вопрос об их переработке в пищевые продукты. Нами предложено применять ИО в качестве рецептурного ингредиента эмульсионных продуктов, а именно, майонезов. Выбор майонезов в качестве эмульсионного продукта обусловлен популярностью этих соусов у потребителей.

Перспективным направлением в производстве эмульсионных продуктов является поиск и применение натуральных ингредиентов. В настоящее время выпускают эмульсионные пищевые продукты как с включением, так и на основе гидробионтов. Спросом пользуются «икорное» масло, эмульсии на основе рыбного фарша, различные соусы и майонезы на основе рыбного бульона [1–5]. Предлагаемое нами введение в состав майонезов ИО позволит не только рационально использовать водные биологические ресурсы, но и внести вклад в решение задачи обеспечения организма человека белковыми веществами.

В соответствии с ГОСТ Р 31761–2012, майонезом считают однородный продукт на основе обратной эмульсии, получаемой из растительных масел и воды, с добавлением (без добавления) таких рецептурных ингредиентов, как молочные продукты, пищевые добавки и другие. Содержание жира в майонезе должно составлять половину и более от его массы, яйцепродуктов – более 1% (в пересчете на сухой желток) [6].

Проводимые исследования целенаправлены на обоснование технологии майонеза с включением доброкачественных отходов икры тихоокеанских лососевых рыб.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта проводимых исследований была определена технология эмульсионного продукта – майонеза с включением ИО тихоокеанских лососевых рыб. Предметами исследования являлись икорные отходы горбуши, посоленные при тех же режимах, что предусмотрены технологической инструкцией № 80 по приготовлению икры лососевой зернистой, майонез с включением ИО.

Базой проведения исследований являлись лаборатории профильной кафедры КамчатГТУ, бактериологические анализы проводились на базе ФГБУ «Камчатская межобластная ветеринарная лаборатория».

При отборе образцов для определения качественных показателей продукции руководствовались ГОСТ 31339–2006 [7]. Оценку органолептических свойств проводили в соответствии с указаниями ГОСТ 7631–2008 [8]. Физико-химические характеристики исследуемых образцов майонеза анализировали по методикам, изложенным в ГОСТ 7636–85 [6]. Срок годности устанавливали на основании изменения микробиологических показателей в процессе хранения продукта.

Подготовку проб для проведения микробиологических исследований осуществляли в соответствии по ГОСТ 26669–85 [10]. Указания ГОСТ 10444.15–94, ГОСТ 31747–2012 [11, 12] послужили основой для проведения анализов. Приемлемость полученных микробиологических показателей эмульсионного продукта определяли, сопоставляя их с показателями, установленными требованиями действующих общего и специального технических регламентов [13, 14].

Для получения экспериментальных образцов в качестве основы принимали рецептуру майонеза домашнего (табл. 1).

Таблица 1

Рецептура майонеза домашнего

Наименование ингредиента	Количество, %
Масло растительное (рафинированное дезодорированное)	61,0
Яйцепродукты (яичные желтки)	30,2
Горчица столовая	4,0

Сахар	1,2
Соль пищевая	0,6
Перец черный молотый	0,2
Уксус столовый 6-процентный	2,8
Всего	100

Подготовка рецептурных ингредиентов для приготовления майонеза предусматривала их взвешивание (табл. 2), санитарную обработку яиц, отделение желтков. Ингредиенты перед загрузкой в чашу миксера выдерживали при комнатной температуре для повышения их температуры до комнатной. Затем в чашу миксера загружали яичные желтки, горчицу, соль, сахар, перец и взбивали смесь на средней скорости в течение 5–7 минут. Добавляли предварительно измельченные в блендере до однородного состояния ИО, а также для некоторых образцов – измельченную до состояния тонкодисперсного порошка сушеную ламинарию. По данным В.Д. Богданова, сочетание белкового и полисахаридного структурообразователей позволяет получать эмульсионные продукты заданных характеристик. В качестве полисахаридной составляющей рекомендовано использовать альгинаты, входящие в состав бурых водорослей, в частности, ламинарии [15]. Вместо ламинариевых водорослей и в сочетании с ними также можно добавлять фукусы, биомасса которых в прибрежной зоне Камчатского полуострова значительна. Затем тонкой струйкой вводили растительное масло, уксус и перемешивали с помощью миксера еще в течение 1–2 минут.

Таблица 2

Рецептурный состав майонеза с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб

Наименование образца	Майонез домашний, г	Икорные отходы, г	Ламинария сушеная, г
И-1	100	5	–
И-2	100	10	–
И-3	100	15	–
И-4	100	17	–
ИЛ-1	100	5	5
ИЛ-2	100	10	7
ИЛ-3	100	15	10
ИЛ-4	100	17	15

Внешний вид полученных образцов приведен на рисунке 1.

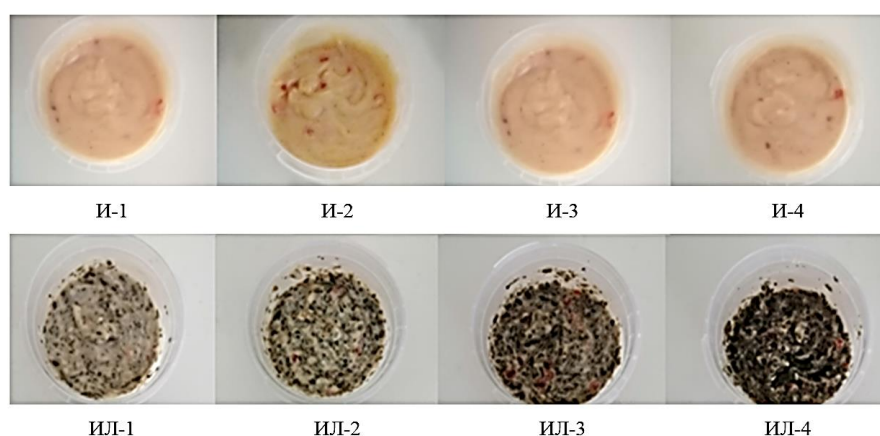


Рис. 1. Внешний вид образцов майонеза с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб

Результаты исследования

Экспертизу качества образцов майонеза проводили по потребительским свойствам, содержанию белка, жира, соли, показателям гидролитического распада жиров и белков с учетом присутствия в майонезе ИО, а также по бактериологическим показателям. Дегустационная комиссия оценивала образцы продукта по пятибалльной шкале (табл. 3).

Таблица 3

Дегустационная оценка образцов майонеза с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб

Наименование показателя	Наименование образца							
	И-1	И-2	И-3	И-4	ИЛ-1	ИЛ-2	ИЛ-3	ИЛ-4
Внешний вид	4,9	4,9	4,5	5	4,8	4	3,9	3,3
Консистенция	4,8	4,8	4,6	4,9	4,9	4,3	3,9	3,3
Цвет	4,9	4,9	4,4	4,9	4,7	4	4	3,4
Вкус	4,8	4,5	4,4	4	4,7	4,1	4,4	4
Запах	4,4	4,5	4,6	4	4,7	4,4	4,1	3,9
Итого	23,8	23,6	22,5	22,8	23,7	20,8	20,3	17,9

По данным таблицы 3, образцы майонезов И-1 и ИЛ-1 имеют рациональное сочетание компонентов в соответствии с принципом формирования пищевой композиции на основе теории создания продукции с заданными органолептическими свойствами [16].

Результаты определения физико-химических показателей образцов майонеза с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб представлены в таблице ниже.

Таблица 4

Показатели пищевой ценности и гидролитического распада белков и жиров экспериментальных образцов майонеза с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб

Наименование образца	Содержание белка, %	Содержание жира, %	Массовая доля соли, %	АЛО, % (с учетом присутствия ИО)	КЧ жира, мг КОН / 1 г жира
И-1	1,08	80,90	1,1	0,009	1,08
И-2	0,54	78,10	1,4	0,006	0,54
И-3	0,03	74,5	1,7	0,006	0,03
И-4	0,79	74,4	2,8	0,004	0,79
ИЛ-1	1,51	74,7	2,5	0,003	1,51
ИЛ-2	0,55	69,7	2,8	0,001	0,55
ИЛ-3	0,46	60,3	3,0	0,003	0,46
ИЛ-4	1,81	53,8	3,6	0,009	1,81

Из таблицы 4 видно, что для всех образцов майонеза характерна массовая доля жира более 50%. Это позволяет отнести продукт к категории майонезов с добавками в соответствии с ГОСТ Р 31761–2012 [6].

Микробиологические показатели образцов майонеза с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб изменялись на протяжении тестового периода хранения (табл. 5).

Таблица 5

Изменение микробиологических показателей экспериментальных образцов майонеза с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб при хранении

Наименование показателя	Сутки хранения					Значение в соответствии с ТР ТС 021/2011
	Фон	1 сутки	3 сутки	5 сутки	8 сутки	
Экспериментальный образец И-1						
Количество БГКП (колиформы) в 0,1 г майонеза	Не обнаружены					Должны отсутствовать
Количество патогенных бактерий в 0,1 г майонеза	Не обнаружены					Должны отсутствовать

Количество колониеобразующих единиц дрожжей в 1 г майонеза	12	14	22	36	54	Не более 50
Количество колониеобразующих единиц плесеней в 1 г майонеза	10	11	19	28	46	Не более 50
Экспериментальный образец ИЛ-1						
Количество БГКП (колиформы) в 0,1 г майонеза	Не обнаружены					Должны отсутствовать
Количество патогенных бактерий в 0,1 г майонеза	Не обнаружены					Должны отсутствовать
Количество колониеобразующих единиц дрожжей в 1 г майонеза	14	17	25	39	52	Не более 50
Количество колониеобразующих единиц плесеней в 1 г майонеза	9	11	11	17	39	Не более 50

Из таблицы видно следующее: при предполагаемом сроке годности 5 суток с учетом коэффициента резерва 1,5 [17], на 5 сутки хранения микробиологические характеристики экспериментальных образцов майонеза с включением ИО соответствовали требованиям действующего технического регламента. На 8 сутки хранения количество дрожжей в образцах превысило допустимые значения, исходя из чего, срок годности продукции ограничили 5 сутками.

Технологическая схема изготовления эмульсионного продукта (майонеза) с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб, представленная на рисунке 2, является результатом данного этапа исследований. Майонез, приготовленный по данной технологии, обладает высокой биологической и пищевой ценностью за счет использования отходов икры тихоокеанских лососевых рыб и ламинарии.

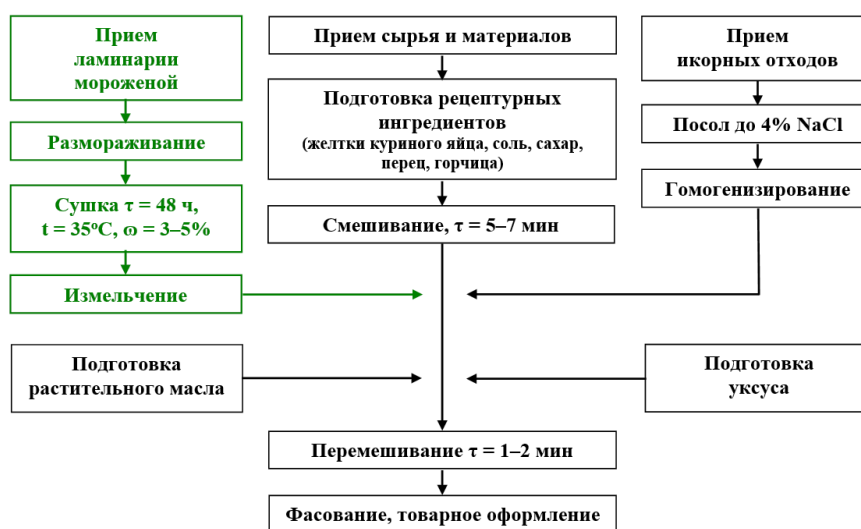


Рис. 2. Технологическая схема производства майонеза с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб (операции, выделенные зеленым цветом, осуществляются при изготовлении майонеза по рецептуре ИЛ-1)

Заключение

Результатом данного этапа исследований явилась технология эмульсионного продукта (майонеза) с включением отходов икры тихоокеанских лососевых рыб. Использование отходов икорного производства позволяет внести вклад в решение проблемы дефицита белков животного происхождения для потребителей, регулярно включающих майонезы в свой рацион. Дополнительно с икорной составляющей в майонез вносится лецитин, обладающий поверхностно-активными свойствами и оказывающий стабилизирующее действие в эмульсиях. Кроме того, лецитин характеризуется гепатопротекторными свойствами, положительно влияет на функции печени.

Установлено, что эмульсионные продукты с добавками икры тихоокеанских лососевых рыб востребованы потребителем. Органолептические и физико-химические показатели разработанного майонеза позволяют судить о его реализуемости в торговой сети.

Рецептурный состав майонеза обеспечивал стабильность его структуры при хранении.

Изготовленный продукт имел жирность свыше 50%, что позволило отнести его к категории майонезов с добавками. Особенностью разработанного продукта является полное отсутствие искусственных консервантов. Майонез с включением ИО может использоваться как основа различных соусов, салатных заправок для приготовления блюд и кулинарных изделий.

Установленный срок годности майонеза с включением ИО – 5 суток, что позволяет организовать выпуск такого майонеза небольшими партиями в условиях малых предприятий. Расфасовка продукта с использованием вакуумирования позволит дополнительно поддерживать стабильность до истечения срока годности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Икорное масло и способ его получения: пат. 2137404 Рос. Федерация / В.В. Сова, Л.С. Абрамова, 1998. – URL: [http:// www.patentdb.ru](http://www.patentdb.ru) (дата обращения: 18.04.2021).
2. Икорное масло и способ его получения: пат. 2251360 / Г.М. Воронин, Э.Б. Лебединский, 2005/ – URL: [http:// www.patentdb.ru](http://www.patentdb.ru) (дата обращения: 16.04.2021).
3. Роль Н.М., Бывальцева Т.М., Якуш Е.В. Микробиологическая оценка технологии эмульсионных продуктов на основе ферментолизата из рыбного фарша // Известия ТИПРО. – 1997. – Т. 120. – С. 204–208.
4. Способ получения майонеза: пат. 1479054 / Т.М. Сафронова, В.Д. Богданов, 1989. – URL: [http:// www.patentdb.ru](http://www.patentdb.ru) (дата обращения: 15.04.2021).
5. Способ приготовления икорного масла на основе икры частиковых рыб: пат. 2685149 / Н.Ю. Углова, М.Д. Мукатова, Н.А. Киричко, 2019. – URL: [http:// www.patentdb.ru](http://www.patentdb.ru) (дата обращения: 16.04.2021).
6. ГОСТ Р 31761–2012 Майонезы и соусы майонезные. Общие технические условия. – Стандартинформ, 2013. – 12 с.
7. ГОСТ 31339–2006 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб. – М.: Стандартинформ, 2010. – 11 с.
8. ГОСТ 7631–2008 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Методы определения органолептических и физических показателей. – М.: Стандартинформ, 2011. – 16 с.
9. ГОСТ 7636–85 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы испытаний. – М.: Стандартинформ, 2010. – 125 с.
10. ГОСТ 26669–85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов. – М.: Стандартинформ, 2010. – 10 с.
11. ГОСТ 10444.15–94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. – М.: Стандартинформ, 2010. – 7 с.
12. ГОСТ 31747–2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). – М.: Стандартинформ, 2013. – 15 с.
13. ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции». – Утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 09 декабря 2011 года № 880. – 242 с.
14. ТР ЕАЭС 040/2016 Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции». – Принят Решением Совета евразийской экономической комиссии от 18 октября 2016 года № 162. – 63 с.
15. Богданов В.Д. Рыбные продукты с регулируемой структурой. – М.: Мир, 2005. – 310 с.
16. Биотехнология морепродуктов: Учебник / Л.С. Байдалинова, А.С. Лысова, О.Я. Мезенова и др. – М.: Мир, 2006. – 560 с.
17. МУК 4.2.1847 Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 31 с.

USE OF WASTE FROM THE PRODUCTION OF CAVIAR PRODUCTS FROM PACIFIC SALMON FISH AS A PRESCRIPTION INGREDIENT OF EMULSION PRODUCTS

¹Chmykhalova Victoria Borisovna, candidate of sciences. biol. sci., assistant professor, head of the department of "Food production technologies"

²Efimova Marina Vasilyevna, candidate of sciences. biol. sci., assistant professor, assistant professor of the department of "Food production technologies"

³Efimov Andrey Anatolyevich, candidate of technical sciences, assistant professor, assistant professor of the department of Food production technologies

^{1,2,3}Kamchatka State Technical University,
Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia, e-mail: ¹chmykhalovav@mail.ru

Salmon caviar is rich in proteins, lipids, vitamins and minerals. The peculiarity of caviar is the emulsifying ability due to the presence of lecithin in the composition. The traditional technology of granular salmon caviar involves the formation of production waste consisting of the shell of the caviar, overripe and immature caviar. Work has been carried out to substantiate the technology of mayonnaise with the addition of good-quality caviar production waste. The introduction of caviar waste into the composition of mayonnaise maintains the stability of the emulsion, provides good organoleptic characteristics of the finished product.