Издательство МГТУ. 183010 Мурманск, Спортивная, 13.
Сдано в набор 12.11.2009. Подписано в печать 12.11.2009. Формат 60×84 1/16.
Бум. типографская. Усл. печ. л. 1,16. Уч.-изд. л. 1,00. Заказ 739. Тираж 100 экз.

*На правах рукописи*

УДК 577.152.3:543.55:574.5:576.8

Кучина

**КУЧИНА ЮЛИЯ АНАТОЛЬЕВНА**

# РАЗРАБОТКА ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

05.18.12 – Процессы и аппараты пищевых производств
05.18.04 – Технология мясных, молочных, рыбных продуктов и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Мурманск – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Мурманский государственный технический университет» на кафедре технологий пищевых производств

Научные руководители:
кандидат технических наук, доцент Дубровин Сергей Юлианович;
кандидат технических наук, профессор Коновалова Ирина Никандровна

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук Мухин Вячеслав Анатольевич;
кандидат технических наук Димова Виктория Витальевна

Ведущая организация:
ОАО «Научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт по развитию и эксплуатации флота (Гипрорыбфлот)» (С.-Петербург)

Защита диссертации состоится « 18 » декабря 2009 г. в 14ч00мин на заседании диссертационного совета Д 307.009.02 в Мурманском государственном техническом университете по адресу: 183010, г. Мурманск, ул. Спортивная, д. 13

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Мурманского государственного технического университета по адресу: 183010, г. Мурманск, ул. Спортивная, д. 13

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 183010, г. Мурманск, ул. Спортивная, д. 13, ФГОУВПО «МГТУ»

Автореферат размещен на сайте www.mstu.edu.ru «17» ноября 2009 г.
Автореферат разослан « 17 » ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. хим. наук, профессор И.Н. Коновалова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Рациональное использование морских биоресурсов является важным направлением современных научных исследований. Решения в этой области связаны с созданием научно обоснованных комплексных малоотходных технологий путем глубокой переработки гидробионтов. Одной из таких технологий является изготовление белковых гидролизатов. Белковые гидролизаты находят широкое применение в медицинской, пищевой, комбикормовой и микробиологической промышленности. Например, они используются для производства микробиологических питательных сред. В связи с дефицитом белоксодержащего сырья животного происхождения в последние годы разрабатываются технологии получения белковых гидролизатов из гидробионтов. В настоящее время более четверти разновидностей микробиологических сухих питательных сред содержат в своем составе панкреатический гидролизат из рыбной муки и различных видов гидробионтов. Поэтому проблемы выбора сырья и совершенствование условий его гидролиза для производства питательных сред являются актуальными. Для гидролиза белоксодержащего сырья в настоящее время используют два основных способа – химический и ферментативный. Совершенствование процесса гидролиза может быть осуществлено в результате применения более дешевой и безопасной электрохимической технологии. При использовании этой технологии для создания необходимых значений pH среды и поддержания температурных режимов используют процесс электролиза водных растворов неорганических солей под действием постоянного электрического тока.

На ОАО «Протеин» (г. Мурманск) и ОАО «Научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт по развитию и эксплуатации флота (Гипрорыбфлот)» (С.-Петербург) были разработаны электрохимические технологии глубокой переработки гидробионтов – получения хитина из хитинсодержащего сырья, щелочных гидролизатов из рыбы, получения альгината из бурых водорослей, электрохимической рафинации рыбных жиров. Сведения о гидролизе белоксодержащего сырья под действием ферментов в процессе электролиза водных растворов неорганических солей в научной и патентной литературе отсутствуют.

**Цель работы.** Изучение процесса получения электрохимическим методом ферментативных белковых гидролизатов из гидробионтов и разработка на его основе технологии гидролизатов микробиологического назначения.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучение процесса электрохимического ферментолиза белоксодержащего сырья.
2. Выбор математической модели, адекватно описывающей процесс электрохимического ферментолиза белоксодержащего сырья.
3. Определение близких к оптимальным параметров процесса электрохимического ферментолиза белоксодержащего сырья и разработка технологической схемы процесса.

ВНИРО
№
Библиотека

4. Оценка протеолитической активности фермента в процессе электролиза раствора хлорида натрия.

5. Проведение сравнительного анализа химического состава белковых гидролизатов, полученных по ферментативной и ферментативной электрохимической технологиям.

6. Оценка возможности использования белковых гидролизатов из путассу, креветки и рыбной муки, полученных по ферментативной электрохимической технологии, в составе микробиологических питательных сред.

**Научная новизна.** Изучен процесс гидролиза белоксодержащего сырья с использованием ферментов и электролиза водных растворов неорганических солей для создания необходимых условий ферментолиза (температуры и значений pH).

Разработана математическая модель, адекватно описывающая процесс ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья электрохимическим методом и установлены близкие к оптимальным параметры процесса.

Найдены условия, при которых физико-химические показатели полученных гидролизатов допускают их использование в качестве основы для приготовления микробиологических питательных сред.

Установлено, что панкреатические гидролизаты, полученные электрохимическим методом, характеризуются более высоким содержанием свободных аминокислот.

Показано, что процессы, происходящие при электролизе неорганической соли, не снижают протеолитическую активность ферментного препарата – панкреатина.

Установлено, что панкреатические гидролизаты из путассу и рыбной муки, полученные электрохимическим методом, могут быть использованы в составе микробиологических питательных сред.

**Практическая значимость.** Изучены основные параметры процесса электрохимического ферментолиза белоксодержащего сырья.

Разработана новая ферментативная технология гидролиза белоксодержащего сырья без применения химически агрессивных реагентов, которая заключается в использовании ферментов в процессе электролиза водных растворов неорганических солей.

Получены панкреатические гидролизаты из рыбной муки, путассу, креветки, сайки и определены близкие к оптимальным параметры технологического процесса.

На основании опытно-промышленных испытаний, проведенных на базе ООО «НТЦ Экобиотек-Мурманск», разработана технологическая инструкция по получению панкреатического гидролизата рыбной муки электрохимическим методом и изготовлена опытная партия гидролизата.

В ФГУ «Мурманский ЦСМ» проведены микробиологические испытания панкреатических гидролизатов, полученных электрохимическим методом, на соответствие требованиям фармакопейной статьи ФС-42-3378-97



«Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРГ-агар)». Установлено, что гидролизаты из путассу и рыбной муки могут быть использованы в составе микробиологических питательных сред.

Получен патент на изобретение 2312514 РФ, МПК-7 А 23J 3/34 «Способ получения белковых ферментативных гидролизатов» № 2006109309/13(010121).

**Основные положения работы, выносимые на защиту:**

1. Результаты изучения влияния основных параметров процесса (природы белоксодержащего сырья, температуры, продолжительности, концентрации фермента) на качество ферментативных белковых гидролизатов, полученных электрохимическим методом.

2. Разработанная технология гидролиза белоксодержащего сырья с использованием ферментов и электролиза водных растворов неорганических солей.

3. Математические модели, описывающие процесс получения панкреатического гидролизата из путассу, креветки и рыбной муки электрохимическим методом и рассчитанные с их помощью технологические параметры процесса, близкие к оптимальным.

4. Сравнительный анализ химического и аминокислотного состава белковой фракции ферментативных гидролизатов, полученных электрохимическим методом.

5. Результаты микробиологических исследований панкреатических гидролизатов в составе питательных сред.

6. Результаты производственной апробации панкреатического гидролиза рыбной муки электрохимическим методом.

7. Технологическая инструкция на электрохимический метод получения панкреатического гидролизата рыбной муки.

8. Технико-экономические показатели эффективности разработанной технологии.

**Внедрение результатов исследований.** На основании проведенных опытно-промышленных испытаний на базе ООО «НТЦ Экобиотек-Мурманск» разработана технологическая инструкция на электрохимический метод получения панкреатического гидролизата рыбной муки. Определены технические требования к оборудованию для аппаратурного оформления процесса получения электрохимическим методом панкреатического гидролизата рыбной муки.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы представлены на научно-технических конференциях профессорско-преподавательского состава, аспирантов, научных и инженерных работников МГТУ «Наука и образование» (г. Мурманск, 2002–2009 г.), V Международной научной конференции «Инновации в науке и образовании – 2007» КГТУ (г. Калининград), 10-ой международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» на базе Казанского государственного технологического университета (г. Казань, 2008), Всероссийской

научно-технической конференции «Современные проблемы экологии» (г. Тула, 2008), международной научно-практической конференции «Техника и технологии переработки гидробионтов и сельскохозяйственного сырья» МГТУ (г. Мурманск, 2008).

Экспериментальная часть работы выполнена в Мурманском государственном техническом университете в рамках научно-исследовательской работы по госбюджетной теме «Химический и электрохимический гидролиз гидробионтов различной природы» (ГР 01200603803).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 работ: 4 статьи в журналах (из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК РФ), получен патент на изобретение.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы (106 наименований) и 5 приложений. Работа изложена на 126 страницах, содержит 25 таблиц, 26 рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Введение.** Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель исследования, научная новизна, защищаемые положения. Показана практическая значимость результатов работы.

**В первой главе** «Обзор литературы» приведен анализ отечественной и зарубежной литературы по вопросам, связанным со способами получения и методами очистки белковых гидролизатов. Рассмотрено влияние физико-химических свойств белковых гидролизатов на возможность их использования в различных отраслях промышленности.

**Во второй главе** «Объекты и методы исследования» определены объекты исследования, методы анализа, приведено описание электрохимического метода получения ферментативных белковых гидролизатов, и порядок статистической обработки экспериментальных данных.

Ферментативный гидролизат из белоксодержащего сырья получали электрохимическим методом в установке для электролиза – электролизере, который представляет собой емкость с двумя угольными электродами. Анодная и катодная части электролизера разделены мембраной. Температуру и значения pH, необходимые для ферментолиза создавали за счет электролиза водного раствора электролита, заполняющего электролизную установку.

В качестве объектов исследования были выбраны – рыбная мука, некондиционная креветка, путассу и сайка. В качестве ферментных препаратов использовали панкреатин (США «ICN Biochemicals») и гепатопанкреатин, полученный по методике, разработанной в Полярном научно-исследовательском институте морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО). Выбранное белоксодержащее сырье является



перспективным для производства ферментативных белковых гидролизатов. Так, рыбная мука удобна для транспортировки и хранения. Выбор креветки объясняется тем, что актуальной является проблема переработки хитинсодержащего сырья с максимальным использованием всех его полезных компонентов. Малорентабельные виды рыб (путассу и сайка) содержат биологически ценный белок и добываются в большом количестве.

Анализ сырья и продуктов выполняли по методикам, описанным в научной литературе и нормативных документах. Химический анализ сырья и продуктов определяли по методикам ГОСТ 7636-85.

Аминокислотный анализ продуктов проводили методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием системы ВЭЖХ LC-10$A_{VP}$ («Shimadzu Corp.», Япония) и колонки Supelcosil$^{TM}$ LC-18 («SUPELCO», США). Молекулярный состав гидролизатов оценивали методом гель-хроматографии на колонке, заполненной сефадексом G-100, используя стандартную аппаратуру «Pharmacia Biotech» (США). Анализ проводили в лаборатории ПИНРО.

Эффективность протеолитического расщепления белоксодержащего сырья определяли расчетным методом, который основан на определении аминного ($N_{ам}$) и общего ($N_{общ}$) азота по ГОСТ 7636-85 и вычислении соотношения: ($N_{ам}$ / $N_{общ}$ ) x 100% = СГ (степень гидролиза).

О влиянии электролиза на активность панкреатина судили по изменению содержания аминного азота в белковом субстрате, который инкубировали с ферментом.

Построение математической модели процесса электрохимического ферментолиза белоксодержащего сырья и поиск оптимальных условий его проведения выполняли по методу Бокса-Уилсона с использованием центральных ортогональных композиционных планов. Расчет коэффициентов уравнений регрессии, проверку адекватности уравнений регрессии и поиск оптимума полученной функции в заданной области факторного пространства осуществляли на ПЭВМ с использованием программы Data Fit Ver. 8.1.

**В третьей главе** «Результаты и их обсуждение» приведены результаты исследований и их обсуждение; разработан процесс получения белковых гидролизатов из гидробионтов ферментативным электрохимическим методом и изучены факторы, влияющие на качество полученных гидролизатов.

### 1. Разработка процесса получения ферментативных белковых гидролизатов электрохимическим методом

***1.1. Выбор электролита.*** Электролиты, используемые для создания условий проведения ферментолиза белоксодержащего сырья, должны полностью растворяться в воде, обеспечивать необходимые значения pH и температуры, не содержать токсичных элементов, быть дешевыми. С этой целью изучили соли: нитраты калия и натрия ($KNO_3$, $NaNO_3$), хлорид натрия (NaCl), сульфат натрия ($Na_2SO_4$). Были рассчитаны теоретиче-

ские и получены экспериментальные данные по изменению температуры и величины pH растворов электролитов в зависимости от концентрации соли при плотности тока 250, 400, 530 А/м$^2$.

Теоретическое изменение температуры раствора ($\Delta T_{теор}$) в условиях эксперимента определяли как отношение теплового эффекта процесса к мольной теплоемкости раствора. При расчете $\Delta T_{теор}$ учитывали, что выделение тепла обусловлено протеканием химической реакции электролиза соли и нагреванием раствора электролита при прохождением через него тока.

С учетом потерь тепловой энергии, для расчета $\Delta T_{теор}$ использовали следующее соотношение:

$$\Delta T_{теор} = I\tau\left(\frac{U}{Cp} + \Delta T_{теор}\frac{Э}{MF}\right) - \frac{Q_3}{Cp},$$

где I – сила тока, А; τ – время электролиза, с; U – напряжение, подаваемое на электроды, В; F – постоянная Фарадея; M и $C_p$ – соответственно молярная масса, г/моль и мольная теплоемкость раствора электролита, Дж/(моль×К); $Q_3$ – потери тепловой энергии, Дж/моль.

Теоретические значения pH рассчитывали по формуле

$$p_a(H+) = 5 - \lg\frac{I \times \tau}{f \times V},$$

где I – сила тока, А; τ – время электролиза, с; $f$ – коэффициент активности ионов водорода в растворе; V – объем раствора, м$^3$.

На основании анализа полученных данных в качестве электролита для проведения ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья электрохимическим методом был выбран 1% раствор хлорида натрия.

Влияние процессов, происходящих в реакционной среде при электролизе раствора хлорида натрия с концентрацией 1–4 %, на протеолитическую активность панкреатина было изучено в ходе ферментолиза рыбной муки и 1 % раствора белка – казеината натрия. Анализ полученных результатов показал, что электрохимические процессы, происходящие при ферментолизе белоксодержащего сырья электрохимическим методом, не снижают протеолитическую активность панкреатина в исследованном интервале концентраций хлорида натрия.

### *1.2. Изучение процесса ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья*

*Предварительная обработка белоксодержащего сырья в электролизере*

Предварительную обработку сырья проводят для того, чтобы технологические параметры реакционной среды соответствовали оптимальным условиям работы ферментного препарата. Обработку сырья в растворе электролита осуществляли токами плотностью не менее 400 А/м$^2$, так как ток более низкой плотности не обеспечивает нагрев реакционной среды до температуры 45–50 °С в условиях эксперимента. Сырье смешивали с раствором электролита в массовом соотношении 1:1 – для дефростированного сырья и 1:8 – для рыбной муки. Поскольку выбранные ферменты имеют наибольшую активность при значениях pH>7, то обработку сырья



проводили в катодной камере электролизера. Анодную камеру заполняли раствором электролита. Зависимость изменения температуры и pH реакционной среды от продолжительности обработки смеси сырье/электролит токами различной плотности представлена на рис. 1.

Анализ данных, приведенных на рис. 1, показал, что предварительную обработку сырья следует проводить при плотности тока 530 А/м$^2$ в 2 этапа: на первом – процесс ведут в течение 40 мин при переменном токе до t = 40–45 °С, затем необходимо заменить переменный ток на постоянный и обрабатывать сырье в течение 15 мин до значений pH = 7,8–8,0 и t = 45–50 °С.

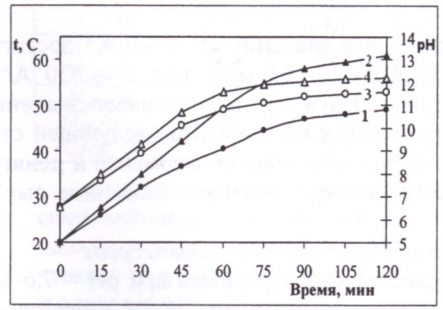


Рис. 1. Зависимость величины pH и температуры (t, °С) от продолжительности обработки сырья токами различной плотности в катодной камере электролизера
1 – t при J = 400 А/м$^2$;
2 – t при J = 530 А/м$^2$;
3 – pH при J = 400 А/м$^2$;
4 – pH при J = 530 А/м$^2$.

*Гидролиз белоксодержащего сырья в катодной камере электролизера*

Ферментные препараты вводили после достижения оптимальных условий для их работы. После введения в камеру электролизера фермента, для обеспечения максимальной скорости реакции ферментативного расщепления, первые 2 часа поддерживали оптимальные значения pH и t °С реакционной среды (t = 48 ± 2 °С и pH = 7,8 ± 0,2). Плотность постоянного тока при этом составила J = 300–400 А/м$^2$. Плотность тока выше 530 А/м$^2$ вызывает перегрев реакционной среды. В дальнейшем, для предотвращения увеличения pH среды, необходимо перейти на переменный ток плотностью J = 300 А/м$^2$, что позволит поддерживать t = 48 ± 2°С в течение последующих 4 часов процесса ферментолиза (значения pH при этом не изменяются).

*Обработка ферментативного гидролизата в кислой среде*

Кислотную обработку гидролизата проводили для его осветления. Для создания значений pH<7, обработку сырья проводили в анодной камере электролизера, так как при прохождении постоянного электрического тока через раствор в анодной камере создается кислая среда. Поскольку на данном этапе не требуется поддержания постоянной температуры, то использовали токи плотностью 250, 400 и 530 А/м$^2$.

Зависимость изменения величины pH реакционной среды от продолжительности обработки токами различной плотности приведена на рис. 2.

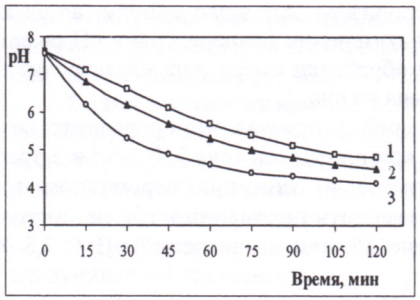


Рис. 2. Зависимость величин pH от продолжительности обработки гидролизатов токами различной плотности в анодной камере электролизера
1 – J = 250 А/м$^2$;
2 – J = 400 А/м$^2$;
3 – J = 530 А/м$^2$.

Анализ кривых на рис. 2 показал, что значения pH = 4,0-4,5 достигаются при плотности тока J = 400 А/м$^2$ за 105 мин, при J = 530 А/м$^2$ за 60–75 мин. Ток плотностью J = 250 А/м$^2$ не обеспечивает значения pH = 4,0–4,5 за исследованный промежуток времени. На следующей стадии гидролизат нагревали до 100 °С для инактивации фермента и денатурации негидролизованных белковых молекул. Негидролизованное сырье удаляли фильтрацией.

*Обработка ферментативного гидролизата в щелочной среде*

На этом этапе проводили нейтрализацию гидролизата при pH = 7,6–8,0 в катодной камере электролизера. Необходимые значения pH достигались в течение 1 часа при прохождении постоянного электрического тока J = 400–530 А/м$^2$. Нейтрализованный гидролизат извлекали из ячейки, нагревали до t = 100 °С, фильтровали и сушили.

Разработанный процесс ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья электрохимическим методом позволяет поддерживать необходимые для ферментолиза значения pH и температуры путем изменения плотности постоянного и переменного тока, без использования концентрированных кислот и щелочей. Это повышает безопасность технологии гидролизатов и улучшает санитарно-гигиенические условия производства.

**2. Факторы, влияющие на процесс ферментолиза белоксодержащего сырья электрохимическим методом**

***2.1. Природа ферментного препарата и белоксодержащего сырья***

Сравнительная характеристика белковой фракции ферментативных гидролизатов, полученных электрохимическим методом под действием панкреатина и гепатопанкреатина, приведена в таблицах 1,2 и на рис. 3. Гидролиз проводили при t = 48 ± 2°С, pH = 7,8–8,0 , времени обработки – 6 часов, количестве вводимого ферментного препарата – 1,25 % от массы сырья. Осветление ферментативного гидролизата в кислой среде проводили при pH = 4,0–4,5; нейтрализацию при pH = 7,6–8,0. Негидролизованное сырье удаляли фильтрацией.

Результаты сравнительного анализа химического состава белковой фракции гидролизатов, полученных по ферментативной и ферментативной электрохимической технологиям, приведены в табл. 1.



Таблица 1

**Сравнительная характеристика белковой фракции гидролизатов из путассу**

| Показатели | Путассу | | | Сайка | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Ферментативная технология (электрохимический метод) | | Ферментативная технология | Ферментативная технология (электрохимический метод) | Ферментативная технология |
| | панкреатин | гепатопанкреатин | панкреатин | панкреатин | панкреатин |
| $N_{об.}$ % | 10,1 | 10,4 | 10,9 | 9,1 | 11,0 |
| $N_{ам.}$ % | 3,9 | 4,1 | 4,2 | 3,3 | 4,4 |
| СГ=$N_{ам.}$/ $N_{об.}$, % | 39,0 | 39,1 | 39,0 | 35,7 | 40,0 |
| $N_{нба.}$ % | 7,9 | 7,5 | 8,7 | 6,7 | 8,6 |
| $N_{нба}/N_{об.}$ | 0,78 | 0,72 | 0,80 | 0,74 | 0,78 |
| САК, % | 23,3 | 23,2 | 21,3 | – | – |

Ферментативные гидролизаты из путассу, полученные электрохимическим методом, под действием различных ферментов имеют практически одинаковые величины СГ и САК (табл. 1). Отношение $N_{нба}/N_{об}$ в панкреатическом гидролизате выше, т.е. этот гидролизат содержит больше поли- и олигопептидов.

Аминокислотный анализ панкреатических гидролизатов из путассу, полученных ферментативным и ферментативным электрохимическим методами, показал, что последний содержит в 1,5–3 раза больше глицина, аргинина и лейцина.

В табл. 2 приведена сравнительная характеристика белковой фракции гидролизатов из креветки, полученных по ферментативной и ферментативной электрохимической технологиям.

Таблица 2

**Сравнительная характеристика белковой фракции гидролизатов из креветки**

| Показатели | Ферментативная технология (электрохимический метод) | | Ферментативная технология | |
|---|---|---|---|---|
| | панкреатин | гепатопанкреатин | панкреатин | гепатопанкреатин |
| $N_{об.}$ % | 9,4 | 9,3 | 10,8 | 12,1 |
| $N_{ам.}$ % | 3,5 | 3,9 | 4,1 | 4,7 |
| СГ=$N_{ам.}$/ $N_{об.}$, % | 37,0 | 41,0 | 38,0 | 38,5 |
| $N_{нба.}$ % | 7,2 | 7,4 | 8,1 | 9,4 |
| $N_{нба}/N_{об.}$ | 0,76 | 0,79 | 0,75 | 0,78 |
| САК, % | 24,9 | 35,3 | – | 35,5 |

Из данных, представленных в табл. 2 следует, что все гидролизаты имеют высокую СГ (37–41 %). Панкреатический гидролизат из креветки, полученный электрохимическим методом, имеет СГ = 37 %, что на 4 % ниже, чем у гидролизата, полученного под действием гепатопанкреатина, и содержит на 10,4 % меньше САК. Очевидно, что ферментный препарат гепа-

топанкреатин проявляет большее сродство к белкам ракообразных. Гидролизаты из креветки, полученные под действием гепатопанкреатина по ферментативной и ферментативной электрохимической технологиям, содержат практически одинаковое количество САК (35,3 % и 35,5 %).

Результаты сравнительного анализа химического и аминокислотного состава панкреатического гидролизата рыбной муки (ПГРМ), полученного электрохимическим методом, показали, что данный гидролизат может быть использован в качестве основы для приготовления микробиологических питательных сред. Свойства белкового гидролизата из рыбной муки, полученного ферментативным электрохимическим методом под действием гепатопанкреатина, не позволяют использовать его для приготовления микробиологических питательных сред из-за низкой СГ (менее 10 %).

Данные, характеризующие молекулярный состав панкреатических гидролизатов из рыбной муки, путассу и креветки, полученных электрохимическим методом, приведены в табл. 3. Результаты молекулярно-массового распределения белковых фракций обрабатывались с помощью программы PeakFit.

Таблица 3

**Молекулярно-массовое распределение белковых фракций в панкреатических гидролизатах**

| Белоксодержащие сырье | Фракции белковых веществ, % | | | |
|---|---|---|---|---|
| | > 100 кД | 100-25 кД | < 25 кД | САК |
| рыбная мука | 9,8 | 16 | 53,6 | 20,6 |
| путассу | 9 | 5,5 | 62,2 | 23,3 |
| креветка | 4 | 8,1 | 63 | 24,9 |

Анализ полученных экспериментальных данных показал, что свойства гидролизатов зависят от природы белоксодержащего сырья и ферментного препарата. Эффективность расщепления (СГ) путассу, сайки и креветки ферментными препаратами – панкреатином и гепатопанкреатином составила 35,7–41 %. ПГРМ полученный электрохимическим методом имеет СГ = 28,9 %.

### *2.2. Продолжительность процесса ферментолиза*

Влияние продолжительности гидролиза на содержание САК и полипептидных фрагментов в ферментативном гидролизате, полученном электрохимическим методом, определяли по изменению концентрации аминного азота (АА). Изменение этого показателя свидетельствует о скорости расщепления белковых молекул в процессе ферментолиза.

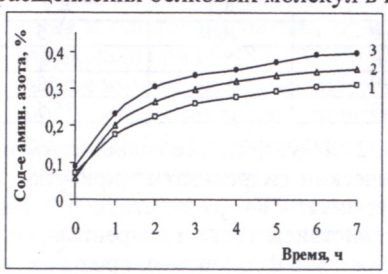


Рис. 3. Изменение концентрации аминного азота в процессе ферментолиза электрохимическим методом
1 – рыбная мука;
2 – креветка;
3 – путассу.



Анализ данных, приведенных на рис. 3, показал, что содержание АА достигает максимальных и практически постоянных значений за 5–6 часов и не зависит от природы белоксодержащего сырья. Наибольшее изменение концентрации АА наблюдается в первые 2 часа ферментолиза. После 6 часов - количество АА в исследуемых гидролизатах достигает 0,30–0,40 %.

### *2.3. Количество ферментного препарата*

Количество вводимого ферментного препарата зависит от активности фермента и требований, предъявляемых к гидролизатам. Гидролизаты, используемые для микробиологических целей, должны содержать общего азота – не менее 9 %, аминного – не менее 2,9 % (ТУ 480-00001927-27-93). Результаты изучения влияния количества ферментного препарата на состав белковой фракции панкреатических гидролизатов, полученных электрохимическим методом, приведены в табл. 4.

Таблица 4

**Сравнительная характеристика белковой фракции панкреатических гидролизатов, полученных электрохимическим методом, при различных концентрациях ферментного препарата**

| Показатели | Белоксодержащее сырье | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Рыбная мука | | | Путассу | | | Креветка | | |
| | Массовая доля вводимого фермента, % | | | | | | | | |
| | 0,75 | 1,25 | 1,75 | 0,75 | 1,25 | 1,75 | 0,75 | 1,25 | 1,75 |
| $N_{ам.}$ % | 2,1 | 3,0 | 3,4 | 2,6 | 3,9 | 4,5 | 2,4 | 3,5 | 4,2 |
| $N_{об.}$ % | 10,1 | 10,5 | 11,2 | 10,6 | 10,1 | 10,5 | 9,9 | 9,4 | 10,0 |
| $N_{нб.}$ % | 5,4 | 7,2 | 7,5 | 6,2 | 7,9 | 8,2 | 6,1 | 7,2 | 7,8 |

Из данных, представленных в табл. 4, следует, что концентрация панкреатина равная 1,25 % масс. является оптимальной. При увеличении концентрации фермента до 1,75 % для более эффективного расщепления белковой молекулы необходимо увеличить гидромодуль, чтобы обеспечить доступ ферментного препарата к макромолекулам белка. Увеличение гидромодуля приведет к росту экономических затрат на стадии сушки гидролизатов.

### *2.4. Температура процесса*

Влияние температуры на эффективность процесса ферментолиза оценивали по изменению содержания АА и САК в гидролизатах (табл. 5).

Таблица 5

**Влияние температуры на состав белковой фракции панкреатических гидролизатов, полученных электрохимическим методом**

| Показатели | Белоксодержащее сырьё | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Рыбная мука | | | Путассу | | | Креветка | | |
| | Температура, °С | | | | | | | | |
| | 45±1 | 50±1 | 55±1 | 45±1 | 50±1 | 55±1 | 45±1 | 50±1 | 55±1 |
| $N_{ам.}$ % | 3,1 | 3,0 | 2,1 | 3,4 | 3,9 | 1,7 | 3,1 | 3,5 | 1,7 |
| $N_{об.}$ % | 10,6 | 10,5 | 10,1 | 10,2 | 10,1 | 10,8 | 9,1 | 9,4 | 9,3 |
| $N_{нб.}$ % | 7,3 | 7,2 | 5,1 | 7,4 | 7,9 | 5,1 | 6,8 | 7,2 | 3,9 |
| СГ=$N_{ам}$/ $N_{об.}$% | 29,0 | 28,9 | 20,6 | 33,2 | 39,0 | 16,0 | 33,6 | 37,0 | 17,8 |

Анализ полученных экспериментальных данных показал, что наибольшее количество АА содержится в гидролизатах из путассу и креветки, полученных при t = 50 ± 1 ºС. Понижение температуры до 45 ± 1 ºС снижает качество гидролизатов. В гидролизатах из рыбной муки, полученных при температурах 45 ± 1 и 50 ± 1 ºС, количество аминного, небелкового азота и СГ практически одинаковы. Количество АА во всех гидролизатах, полученных при t = 55 ± 1°С, уменьшилось в 1,5 раза, а СГ снизилась до 16–20 %. При температуре выше 54–55 °С преобладает процесс деструкции белков, приводящий к инактивации ферментного препарата.

**В четвертой главе** «Разработка технологии получения белковых гидролизатов на основании изучения процесса электрохимического ферментолиза белоксодержащего сырья» определены близкие к оптимальным технологические параметры процесса, разработана электрохимическая технология получения ферментативных гидролизатов из гидробионтов и продуктов их переработки. Изучена возможность использования панкреатических гидролизатов, полученных по разработанной технологии, в качестве основы для приготовления питательных сред, рассчитан экономический эффект.

При моделировании процесса получения панкреатических гидролизатов из гидробионтов электрохимическим методом было использовано центральное ортогональное композиционное планирование, полнофакторный эксперимент. В качестве функции отклика $Y$ была выбрана СГ, в качестве влияющих факторов: температура ферментолиза $x_1$, ºС, и продолжительность процесса $x_2$, час. Математическая модель, описывающая процесс ферментолиза белоксодержащего сырья электрохимическим методом была получена с помощью компьютерной программы DataFit ver 8.1, позволяющей получать уравнение регрессии, связывающее функцию отклика с выбранным количеством влияющих факторов.

Поверхности функции отклика $Y$ в зависимости от влияющих факторов при ферментолизе путассу, рыбной муки и креветки электрохимическим методом представлены на рис. 4, 5, 6.

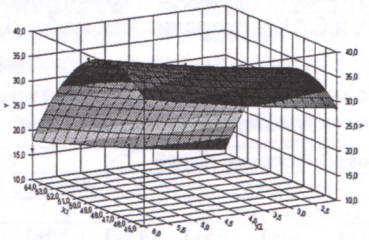

Рис. 4. Поверхность функции отклика $Y$ – СГ панкреатического гидролизата из путассу, полученного электрохимическим методом

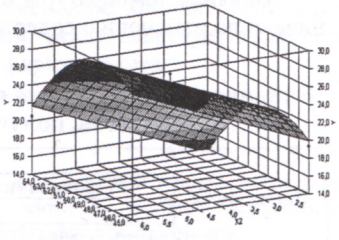

Рис. 5. Поверхность функции отклика $Y$ – СГ панкреатического гидролизата из рыбной муки, полученного электрохимическим методом



Уравнение регрессии процесса ферментолиза путассу электрохимическим методом: $Y = -1074 + 45{,}96\,x_1 - 0{,}4776\,x_1^2 + 0{,}72\,x_2 + 0{,}13\,x_2^2$.

Расчетные значения влияющих факторов, наиболее близкие к оптимальным: при $x_1$=50 ºС; $x_1$=6 часов.

Уравнение регрессии процесса ферментативного гидролиза рыбной муки электрохимическим методом: $Y = -392{,}2 + 17{,}01\,x_1 - 0{,}176\,x_1^2 + 2{,}04\,x_2$.

Расчетные значения влияющих факторов, наиболее близкие к оптимальным: при $x_1$=45 ºС; $x_1$=6 часов.

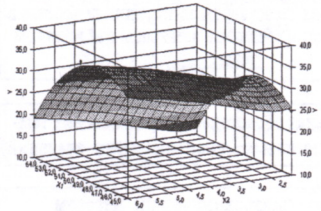

Рис. 6. Поверхность функции отклика $Y$ – СГ панкреатического гидролизата из креветки, полученного электрохимическим методом

Уравнение регрессии процесса ферментативного гидролиза креветки электрохимическим методов:

$Y = -851 + 37{,}4\,x_1 - 0{,}3879\,x_1^2 - 91{,}4 / x_2 + 102{,}4 / x_2^2$.

Расчетные значения влияющих факторов, наиболее близкие к оптимальным: при $x_1$=50 ºС; $x_1$=6 часов.

Анализ полученных данных показал, что продолжительность процесса ферментолиза электрохимическим методом не имеет оптимума на поверхности функции отклика, но для получения панкреатических гидролизатов с высокой СГ достаточно 6 часов. Поэтому, рациональными условиями протекания процесса ферментолиза электрохимическим методом являются: температура 45–50 °С, продолжительность – 6 часов.

Технологическая схема процесса получения панкреатических гидролизатов электрохимическим методом представлена на рис. 7.

По физико-химическим показателям панкреатический гидролизат, полученный электрохимическим методом, должен соответствовать требованиям, предъявляемым к гидролизатам, используемым в микробиологических питательных средах.

В табл. 6 приведена характеристика панкреатических гидролизатов, полученных электрохимическим методом, на соответствие требованиям ТУ-480-00001927-27-93 «Панкреатический гидролизат рыбной муки».

Таблица 6

**Физико-химические показатели панкреатических гидролизатов, полученных электрохимическим методом**

| Наименование показателя | Требования ТУ-480-00001927-27-93 | Панкреатический гидролизат | | |
|---|---|---|---|---|
| | | рыбной муки | путассу | креветки |
| Массовая доля влаги, % | не более 7 | 6,0 ± 0,5 | 6,0 ± 0,5 | 6,0 ± 0,5 |
| Массовая доля аминного азота, % | 3,4 ± 0,5 | 3,1 ± 0,2 | 3,9 ± 0,2 | 3,6 ± 0,3 |
| Массовая доля общего азота, % | 10 ± 2 | 10,2 ± 0,3 | 10,5 ± 0,5 | 10,0 ± 0,7 |
| Массовая доля хлорида натрия, % | 20 ± 5 | 19 ± 3 | 18 ± 1 | 18 ± 1 |
| Концентрация ионов водорода, pH | 7,5 ± 0,5 | 7,8 ± 0,2 | 7,8 ± 0,2 | 7,8 ± 0,2 |

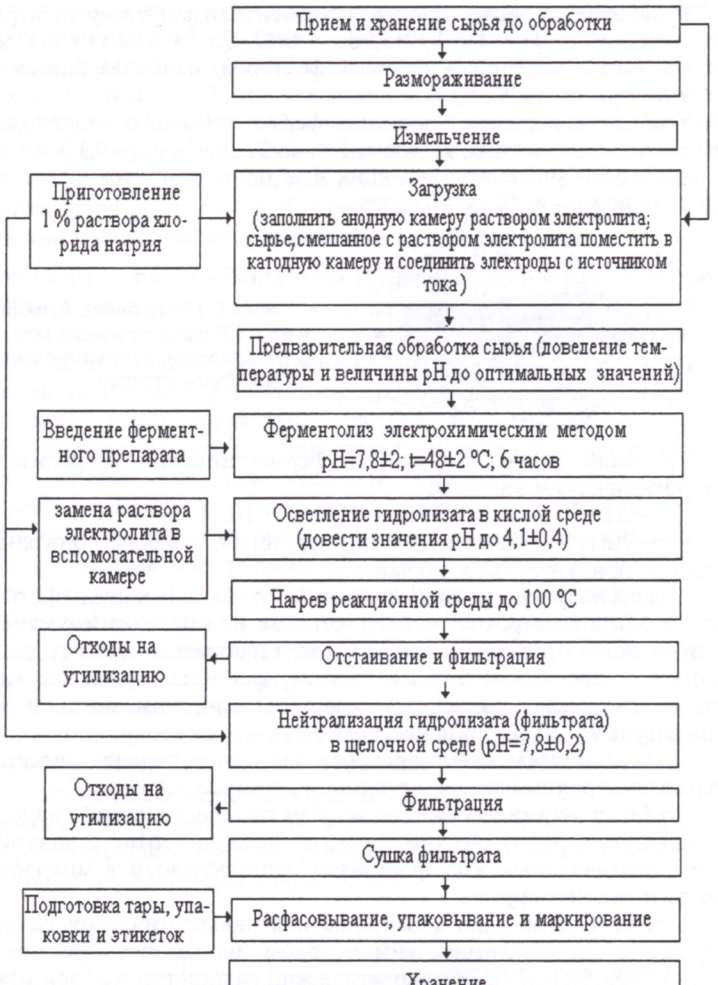


Рис. 7. Технологическая схема получения панкреатического гидролизата из гидробионтов и продуктов их переработки электрохимическим методом

На основании полученных экспериментальных данных и в соответствии с технологической схемой получения панкреатического гидролизата электрохимическим методом, были разработаны исходные данные для проектирования технологии ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья. Принципиальная схема получения ферментативных гидролизатов из гидробионтов и продуктов их переработки электрохимическим методом представлена на рис. 8.



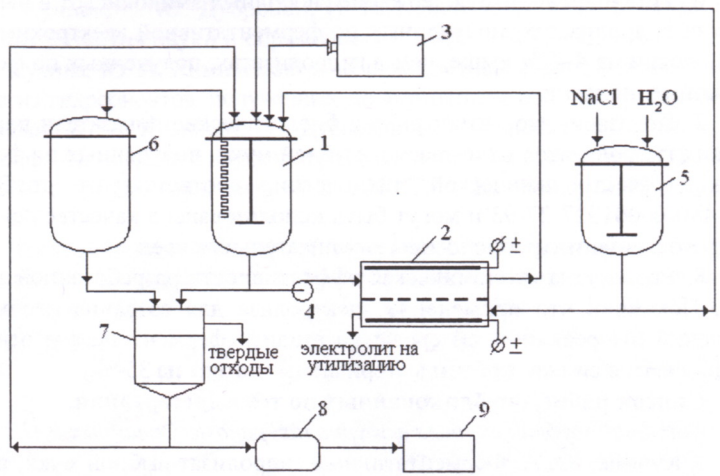


Рис. 8. Принципиальная технологическая схема получения ферментативных гидролизатов из гидробионтов электрохимическим методом: 1, 5 – реактор с мешалкой; 2 – электролитическая ячейка; 3– волчок; 4 – насос; 6 –сборник; 7– нутч-фильтр; 8 – емкость; 9 – распылительная сушилка

## ВЫВОДЫ

1. Впервые изучен процесс электрохимического ферментолиза белоксодержащего сырья. Показано влияние электролитов: хлорида натрия (NaCl), сульфата натрия ($Na_2SO_4$), нитратов калия и натрия ($KNO_3$, $NaNO_3$) и их концентраций на величину pH и температурный режим процесса. В качестве электролита для проведения процесса ферментолиза выбран раствор хлорида натрия с массовой долей 1 %.

2. Определены близкие к оптимальным параметры процесса панкреатического гидролиза изученного белоксодержащего сырья. Установлено, что химический состав, молекулярно-массовое распределение белковых фракций и содержание свободных аминокислот в панкреатических гидролизатах зависит от природы фермента и белоксодержащего сырья.

3. Установлено, что электрохимические процессы, происходящие при электролизе, не снижают протеолитическую активность ферментного препарата – панкреатина.

4. Разработаны математические модели адекватно описывающие процесс электрохимического ферментолиза белоксодержащего сырья.

5. Разработана технология гидролиза белоксодержащего сырья с использованием ферментов и электролиза неорганических солей для создания оптимальных условий при проведении процесса ферментолиза (температуры и значений pH).

6. Установлено, что содержание свободных аминокислот в панкреатических гидролизатах, полученных по ферментативной электрохимической технологии на 4–6 % выше, чем в гидролизатах, полученных по ферментативной технологии.

7. Показано, что химические и биологические показатели панкреатических гидролизатов из путассу и рыбной муки, полученных по ферментативной электрохимической технологии, соответствуют требованиям ТУ-480-00001927-27-93 и могут быть использованы в качестве основы для приготовления микробиологических питательных сред.

8. Рассчитана экономическая эффективность разработанной технологии. Показано, что применение электролиза для создания необходимых значений pH реакционной среды на стадиях ферментолиза и осветления гидролизатов снижает объем материальных затрат на 35 %.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

*Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:*

1. Кучина, Ю. А. Ферментативный гидролизат рыбной муки, полученный электрохимическим способом / Ю. А. Кучина, С. Ю. Дубровин, И. Н. Коновалова // Хранение и переработка сельскохозяйственного сырья. – 2009. – № 6. – С. 24–25.

2. Кучина, Ю. А. Ферментативный белковый гидролизат из путассу, полученный электрохимическим методом / Ю. А. Кучина, С. Ю. Дубровин, И. Н. Коновалова // Рыб. хоз-во. – 2009. – № 4. – С. 115–116.

*Статьи в журналах и материалы конференций:*

1. К вопросу о производстве ферментативных белковых гидролизатов с использованием электрохимической технологии / Ю. А. Кучина, П. Б. Василевский, С. Ю. Дубровин, И. Н. Коновалова // Материалы Всерос. науч.-техн. конф «Наука и образование – 2002», Мурманск, 16–29 апреля 2002 г. / Мурман. гос. техн. ун-т. – Мурманск, 2002. – С. 629–630.

2. Система терморегулирования реакционных смесей в электрохимических технологиях производства продуктов из гидробионтов / В. И. Волченко, Ю. А. Кучина, В. Н. Маркин, П. Б. Василевский // Материалы Всерос. науч.-техн. конф. «Наука и образование – 2003», Мурманск, 2–16 апреля 2003 г. : в 5 ч. / МГТУ. – Мурманск, 2003. – Ч. 4. – С. 188–190.

3. Кучина, Ю. А. Белковые ферментативные гидролизаты из гидробионтов, полученные электрохимическим способом / Ю. А. Кучина, С. Ю. Дубровин, И. Н. Коновалова // Наука и образование-2007 [Электронный ресурс] : междунар. научн.-техн. конф., Мурманск, 4–13 апреля 2007 г. / Мурман. гос. техн. ун-т. – Электрон. текст дан. (18 Мб). – Мурманск : МГТУ, 2007. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – С. 629–630. – Гос. рег. НТЦ «Информрегистр» № 0320700491 от 05.03.07.

4. Панкреатический гидролизат рыбной муки, полученный электрохимическим методом, как основа микробиологических питательных сред / Ю. А. Кучина, С. Ю. Дубровин, И. Н. Коновалова, Т. И. Молчановская // Вестник развития науки и образования. – 2007. – № 4. – С. 9–14.

5. Кучина, Ю. А. Химический и аминокислотный анализ белковых гидролизатов из гидробионтов, полученных по ферментативной электрохимической технологии / Ю. А. Кучина, С. Ю. Дубровин, И. Н. Коновалова // V Междунар. науч. конф. «Инновации в науке и образовании – 2007», Калининград, 23–25 октября 2007 г. : труды науч. конф. : в 2 ч. / КГТУ. – Калининград, 2007. – Ч. 1. – С. 354–357.

6. Электрохимический способ получения ферментативных белковых гидролизатов из гидробионтов, используемых для приготовления микробиологических питательных сред / Ю. А. Кучина, Е. В. Шошина, С. Ю. Дубровин, Н. М. Путинцев, И. Н. Коновалова, П. Б. Василевский // Вестник МГТУ : труды Мурман. гос. техн. ун-та. – Мурманск, 2007. – Т. 10, № 4. – С. 628–632.

7. Кучина, Ю. А. Влияние электролиза на свойства панкреатина при гидролизе белоксодержащего сырья / Ю. А. Кучина // Техника и технологии переработки гидробионтов и сельскохозяйственного сырья : материалы междунар. науч.-практ. конф. посвящ. памяти проф. Н. Н. Рулева, Мурманск, 24–25 апреля 2008 г. / Мурман. гос. техн. ун-т. – Мурманск, 2008. – С. 46.

8. Ку[illegible]олизаты из гидробионтов, полу[illegible]чина, С. Ю. Дубровин, И. Н[illegible]менные проблемы экологии»[illegible]П. Мешалкина. – Тула, 200[illegible]

9. Ку[illegible]ическую активность па[illegible] Н. Коновалова // X межд[illegible]ии и биотехнологии» : [illegible]зань, 12–15 мая 2009 г. / К[illegible]

10. С[illegible]о гидролизата из креве[illegible]Н. Коновалова, Т. И. Мо[illegible]онный ресурс] : междунар[illegible]9 г. / МГТУ. – Электрон[illegible]1 электрон. опт. диск (С[illegible]Информрегистр» № 03209[illegible]