

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ СУХИХ КОНЦЕНТРАТОВ ИЗ СЫРЬЯ МАРАЛОВ

M.G. Krotova, I.N. Grishaeva

STUDYING SAFETY AND RELATIVE BIOAVAILABILITY OF DRY CONCENTRATES FROM MARAL RAW MATERIALS

**Кротова М.Г.** – канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр. Всероссийского НИИ пантового оленеводства Федерального Алтайского научного центра агробiotехнологий, г. Барнаул.

E-mail: wniipo@rambler.ru

**Гришаева И.Н.** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Всероссийского НИИ пантового оленеводства Федерального Алтайского научного центра агробiotехнологий, г. Барнаул.

E-mail: wniipo@rambler.ru

**Krotova M.G.** – Cand. Agr. Sci., Senior Staff Scientist, All-Russia Research and Development Institute of Reindeer Breeding for Velvet Antlers, Federal Altai Research Center of Agrobiotechnologies, Barnaul.

E-mail: wniipo@rambler.ru

**Grishaeva I.N.** – Cand. Biol. Sci., Leading Staff Scientist, All-Russia Research and Development Institute of Reindeer Breeding for Velvet Antlers, Federal Altai Research Center of Agrobiotechnologies, Barnaul. E-mail: wniipo@rambler.ru

Цель исследования – изучение безопасности и биологической ценности сухого концентрата из сырья маралов, полученного путем гидролиза с применением различных ферментов и их систем. Объектом исследования служили сухие концентраты из сырья маралов (хвостов, репродуктивных органов самцов маралов, маток с эмбрионами и околоплодной жидкостью, сухожилий), полученные путем ферментативного гидролиза сырья в поле ультразвука мощностью 37 кВт при температуре 45–50 °С с применением ферментов микробного происхождения – протозима В (щелочная бактериальная протеаза), протозима С (щелочная грибная протеаза) и протозима ЛП (кислая грибная протеаза). Изучена безопасность и относительная биологическая ценность концентратов с применением тест-культуры инфузорий-стилонихий. Для оценки исследуемых параметров однопроцентную водную вытяжку из концентратов в количестве 200 мкл добавляли к суточной культуре инфузорий. Проводили визуальную оценку состояния, формы клетки, а также наличия гибели единичных особей в течение 3 ч. Подсчет особей проводили через 24 ч от начала эксперимента с использованием камеры Горяева под микроскопом при увеличении 4×10. Показа-

но, что концентраты, полученные по новой технологии, не оказывают токсического действия на клетку инфузорий, которые на протяжении всего эксперимента сохраняли подвижность и обычную форму. Образцы концентратов из хвостов марала с протозимом ЛП на 11 % превосходили эталонный белок по показателю относительной биологической ценности, а биосубстанции, полученные из репродуктивных органов с протозимами и бактериальной протеазой – на 20 и 79 % соответственно, что свидетельствует о положительном воздействии концентратов из сырья маралов на жизнедеятельность и развитие живой клетки и полноценности белковой составляющей полученного продукта.

**Ключевые слова:** марал, инфузории, концентрат, ферменты, относительная биологическая ценность, токсичность.

The research objective was studying the safety and biological value of dry concentrate from maral raw materials received by hydrolysis with using various enzymes and their systems. The objects of the research were dry concentrates obtained from maral materials (tails, reproductive organs of male marals, uterus with embryos and amniotic fluid, tendons) received through enzymatic hydrolysis in

a 37 kHz ultrasound field at the temperature 45–50°C using enzymes of microbial origin: protozyme B (bacterial alkaline protease), protozyme C (fungal alkaline protease) and protozyme LP (acid fungal protease). A test culture of infusoria (*stylonychia*) was used to study the safety and relative bioavailability of the concentrates. For the assessment of the parameters being studied, 200 µl of 1 % concentrate water extract was added to a one-day infusoria culture. Visual assessment was conducted to identify the condition and shape of the cells, as well as the presence of any dead specimens within three hours. The specimens were counted in 24 hours from the start of the experiment using the Goryaev's counting chamber and a microscope (4×10 magnification). It was established that the concentrates obtained using the new technology had not had any toxic effect on the infusoria cell, the latter being active and of normal shape during the whole experiment. The samples of the concentrates obtained from maral tails using Protozyme LP surpassed the reference protein by 11 % in terms of their relative bioavailability, and the biosubstances obtained from maral reproductive organs using protozymes and bacterial protease surpassed the reference protein by 20 % and 79 %, respectively, testifying to positive effect of the concentrates obtained from maral materials on vital activity and the development of live cell and the adequacy of the protein component in obtained product.

**Keywords:** maral, infusoria, concentrate, enzymes, relative bioavailability, toxicity.

**Введение.** На сегодняшний день в нашей стране наблюдается тенденция ухудшения здоровья населения и снижение иммунитета, особенно к острым респираторным заболеваниям и вирусу гриппа.

Согласно последним данным мониторинга, выявлено, что снижение статуса здоровья населения России на 75–85 % связано с неправильным питанием, снижением качества потребляемых пищевых продуктов и малым потреблением пищи, богатой витаминами, аминокислотами, макро- и микроэлементами.

Современные производители БАДов и витаминов предлагают множество средств, позво-

ляющих восполнить недостаток важных компонентов питания и стимулировать организм, но зачастую в основе предлагаемых препаратов находятся вещества, синтезированные химическим путем и являющиеся чужеродными для человеческого организма. Сегодня широкую популярность приобретают препараты, полученные из сырья пантовых оленей. Биохимический состав продукции пантового оленеводства представлен огромным спектром биологически активных веществ, таких как белки, аминокислоты, факторы роста и т. д., уникальность которых заключается в сродстве с естественными регуляторами организма человека.

Во Всероссийском научно-исследовательском институте пантового оленеводства разработаны способы получения растворимых концентратов из сырья маралов, основанные на ферментном гидролизе [1–3]. Применение протеолиза в процессе переработки сырья обеспечивает возможность проведения гидролиза в лояльных условиях, исключая высокотемпературную обработку, что позволяет сохранить более полный набор аминокислот и витаминов в готовом продукте, улучшив при этом его переваримость [4, 5]. Концентраты из сырья маралов, полученные по новой технологии, можно включать в состав пищевых продуктов, что позволит обогатить их макро- и микроэлементами, незаменимыми аминокислотами и витаминами.

Среди требований к качеству продуктов питания выделяют такие показатели, как безопасность для здоровья человека и их относительная биологическая ценность (ОБЦ) [6]. Существует методика определения безвредности (токсичности) и биологической ценности на живой клетке инфузории. Инфузории как тест-объекты имеют ряд преимуществ, таких как короткий жизненный цикл, высокая скорость размножения, чувствительность к токсичным веществам, наличие ферментных систем, адекватных высшим животным [7].

**Цель исследования:** изучение безопасности и биологической ценности сухого концентрата из сырья маралов, полученного путем гидролиза с применением различных ферментов и их систем.

**Материалы и методы исследования.** В качестве объекта исследования были сухие концентраты из сырья маралов (хвосты, репродуктивные органы самцов, матки с эмбрионами, сухожилия), полученные путем гидролиза в течение 8–10 ч в поле ультразвука с частотой колебаний 37 кГц. Для расщепления белковой составляющей исходного сырья в процессе гидролиза применяли протеолитические ферменты микробного происхождения: протамекс на основе *Bacillus protease*; протозим С – щелочная грибная протеаза, протозим В – щелочная бактериальная протеаза на основе *Bacillus licheniformis*, протозим ЛП – комплекс кислых протеаз на основе *Penicillium canescens*; бактериальная протеаза – на основе *Bacillus subtilis*.

Полученный гидролизат высушивали в инфракрасной сушке до остаточной влажности 8–10 %.

С применением тест-культуры инфузорий проводили оценку токсичности и ОБЦ полученных концентратов из сырья маралов. Для этого из подготовленных образцов полученного концентрата отбирали навески и готовили водную вытяжку, где концентрация продукта соответствовала 1 %, для этого к 1 г концентрата добавляли 100 мл воды, размешивали в течение 20 мин, после чего смесь фильтровали через бумажный фильтр. Суточную культуру стилонихий в количестве 10–20 шт. отбирали меланжером в микроаквариумы и вносили водный раствор исследуемых концентратов в количестве 20 мкл специальным дозатором, повторно подсчитывали особей. Затем в микроаквариум вносили 200 мкл исследуемого образца. Контролем служил эталонный белок (казеин), из которого готовили среднюю пробу с концентрацией протеина 1 %. Для определения токсичности на-

блюдали за объектами в течение 3 ч. Гибель инфузорий устанавливали визуально по прекращению движения и наличию признаков разрушения клеток. Степень токсичности обозначалась по промежуткам времени до гибели тест-объекта: если инфузории погибают в течение 3 мин, субстрат считается остро токсичным, в течение 10 мин – токсичным, более 3 ч – объект не токсичен [8].

Через 24 ч проводили контроль роста и развития инфузорий под микроскопом при увеличении 4×10. Подсчет инфузорий проводили с применением камеры Горяева. Исходя из полученных значений рассчитывали показатель ОБЦ, выражаемый как соотношение выросших особей в исследуемых пробах к количеству инфузорий в контрольном образце.

**Результаты исследования.** По результатам проведенных исследований сухих концентратов из сырья маралов, приготовленных с применением различных ферментов, визуально не наблюдалось гибели единичных особей в течение 3 ч и далее. Инфузории сохраняли естественную подвижность и активность. Мутации, проявляемые у одноклеточных в виде изменения формы и деформации клеточной стенки, не были установлены. Данные, полученные путем биотестирования представленных образцов, свидетельствуют о их биологической безопасности.

Исследована динамика роста простейших в течение суток с целью выявления биологической активности полученных биосубстанций (табл. 1).

Таблица 1

Оценка роста и развития инфузорий полученных концентратов

Исследуемый образец	Генерация простейших за 24 ч	ОБЦ, %
1	2	3
Контроль (казеин)	45,0	100
1. Хвосты + протозим ЛП	50	111
2. Хвосты + бактериальная протеаза	35	77
3. Хвосты + протомекс	28	62
4. Хвосты + протозим В + протозим ЛП	35	78

Окончание табл. 1

1	2	3
5.Репродуктивные органы самцов + протозим ЛП	23	51
6. Репродуктивные органы самцов + протамекс	10	22
7. Репродуктивные органы самцов + бактериальная протеаза	81	179
8. Репродуктивные органы самцов + протозим В + протозим ЛП	13	29
9. Репродуктивные органы самцов + протозим В + протозим С + протозим ЛП	54	120
10. Матки + протозим ЛП	38	84
11. Матки + протамекс	15	33
12. Матки + бактериальная протеаза	20	44
13. Сухожилия + протозим ЛП	12	27
14. Сухожилия + протозим В + протозим ЛП	10	22
15.Сухожилия + бактериальная протеаза + папаин	27	60

Согласно полученным данным, концентраты из сырья маралов отличались по относительной биологической ценности в зависимости от вида сырья и вносимых ферментов при его гидроли-

зе. Для образца № 3 (хвосты + протамекс) свойственен минимальный прирост простейших, который на 20–45 % был ниже по сравнению с другими образцами (рис. 1).

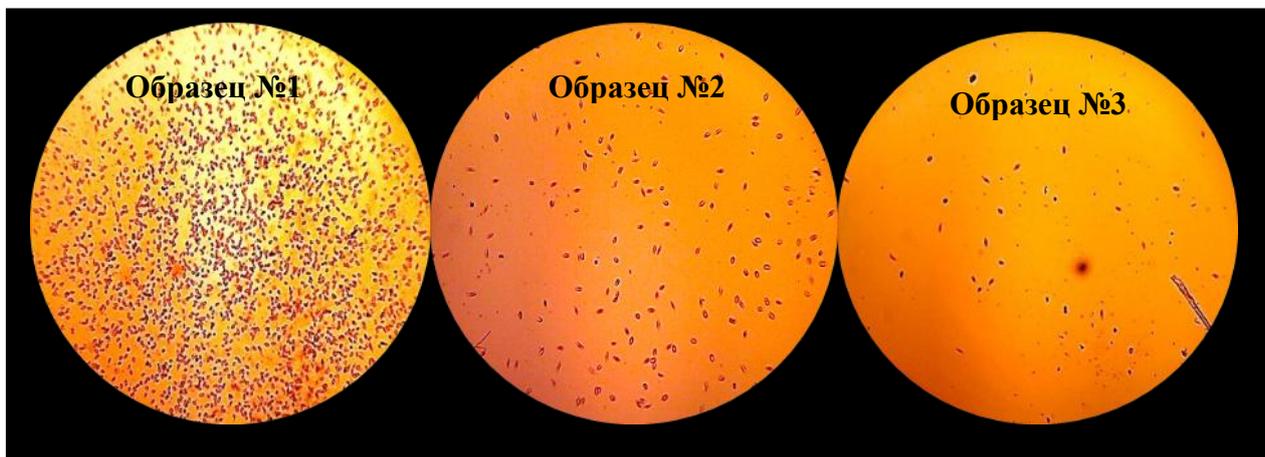


Рис. 1. Оценка роста и развития инфузорий в исследуемых образцах концентратов: образец № 1 (Хвосты + протозим ЛП), образец № 2 (Хвосты + бактериальная протеаза), образец № 3 (Хвосты + протамекс)

Исследуемая проба концентрата, полученная при гидролизе хвостов марала с ферментом протозим ЛП, характеризовалась высоким показателем ОБЦ, который на 11 % превышал эталонный белок, что может быть обусловлено тем, что казеин является сложным, многокомпонентным белком, медленно переваривающимся и обеспечивающим организм питательными веществами длительный период времени [8].

Исходя из утверждения, что на ОБЦ влияет доступность для простейших белка пищи, можно высказать предположение, что в результате об-

работки хвостов марала ферментом протозим ЛП достигается максимальный выход питательных компонентов сырья в легкоусвояемой форме, что и обеспечило высокий показатель биологической ценности данного продукта.

Среди представленных концентратов, приготовленных из репродуктивных органов самцов маралов с применением различных ферментов, показатель относительной биологической ценности колебался в пределах от 22 до 179 %. Данная разница обусловлена высокой субстратной специфичностью представленных

ферментов к белковым молекулам репродуктивных органов, а следовательно наблюдалось более полное расщепление белка до низкомолекулярных легкоусвояемых фракций в образцах № 7 (Репродуктивные органы самцов + бактериальная протеаза) и № 9 (Репродуктивные органы самцов + протозим В + протозим С + протозим ЛП).

Добавление водной вытяжки концентратов из маток с эмбрионами и сухожилий оказало положительное влияние на развитие культуры стилопониий, при этом относительная биологическая ценность колебалась в пределах от 22 до 84 %. Максимальный рост простейших отмечен в образцах № 10 (матки + протозим ЛП), № 15 (сухожилия + протозим ЛП + папаин).

Таким образом, данные проведенного исследования показывают, что концентраты из сырья маралов, приготовленные по технологии с применением современных ферментных препаратов микробного происхождения, обладают высокой относительной биологической ценностью, которая в отдельных образцах превышает данный показатель эталонного белка на величину от 11 до 78 %, и, следовательно, могут оказывать положительное воздействие на жизнедеятельность живой клетки и ее развитие.

### **Выводы**

1. Концентраты из сырья маралов, приготовленные по новой технологии с использованием ферментов микробного происхождения, не оказывают токсическое действие на тест-культуру инфузорий и являются безопасными для здоровья человека.

2. Концентраты из сырья маралов по показателю относительной биологической ценности сопоставимы с эталонным белком, что свидетельствует о наличии большого количества питательных компонентов в легкоусвояемой форме.

### **Литература**

1. Луницын В.Г., Неприятель А.А. Безотходная технология переработки продукции пантового оленеводства // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2016. – № 5. – С. 83–91.

2. Луницын В.Г., Неприятель А.А. Новые продукты функционального питания на основе продукции мараловодства // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2017. – № 4. – С. 87–92.
3. Луницын В.Г., Белозерских И.С. Анализ биохимического состава биосубстанций полученных ферментативным гидролизом в поле ультразвука // Проблемы пантового оленеводства и пути их решения: сб. науч. тр. ВНИИПО. – Барнаул, 2016. – Т. 9. – С. 139–142.
4. Кильмаев А.А., Разумовская Р.Г. Исследование ферментативного гидролиза малоценного рыбного сырья в технологии получения белковых продуктов // Вестн. АГТУ. – 2007. – № 3. – С. 120–123.
5. Курбанова М.Г., Соболева О.М., Добрынина Е.О. Роль ферментов в пищевых технологиях // Вестн. Кемеров. гос. с.-х. ин-та. – 2011. – № 4. – С. 191–199.
6. Черемных Е.Г., Кулешин А.В., Кулешина О.Н. Биотестирование пищевых добавок на инфузориях // Вестн. РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2011. – № 3. – С. 5–12.
7. Богданов В.Д., Сахарова О.В., Сахарова Т.Г. Исследование безопасности и биологической ценности сухого концентрата трепанга биотестированием // Науч. тр. Дальрыбвтуза. – Владивосток, 2016. – Т. 37. – С. 93–98.
8. ГОСТ 31674–2012. Корма комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. – М.: Стандартинформ, 2013. – С. 8–10.

### **Literatura**

1. Lunicyn V.G., Neprijatel' A.A. Bezothodnaja tehnologija pererabotki produkcii pantovogo olenevodstva // Sib. vestn. s.-h. nauki. – 2016. – № 5. – S. 83–91.
2. Lunicyn V.G., Neprijatel' A.A. Novye produkty funkcional'nogo pitaniya na osnove produkcii maralovodstva // Sib. vestn. s.-h. nauki. – 2017. – № 4. – S. 87–92.
3. Lunicyn V.G., Belozerskih I.S. Analiz biohimicheskogo sostava biosubstancij

- poluchennyh fermentativnym gidrolizom v pole ul'trazvuka // Problemy pantovogo olenevodstva i puti ih reshenija: sb. nauch. tr. VNIPO. – Barnaul, 2016. – T. 9. – S. 139–142.
4. *Kil'maev A.A., Razumovskaja R.G.* Issledovanie fermentativnogo gidroliza malocennogo rybnogo syr'ja v tehnologii poluchenija belkovyh produktov // Vestn. AGTU. – 2007. – № 3. – S. 120–123.
  5. *Kurbanova M.G., Soboleva O.M., Dobrynina E.O.* Rol' fermentov v pishhevyh tehnologijah // Vestn. Kemerov. gos. s.-h. in-ta. – 2011. – № 4. – S. 191–199.
  6. *Cheremnyh E.G., Kuleshin A.V., Kuleshina O.N.* Biotestirovanie pishhevyh dobavok na infuzorijah // Vestn. RUDN. Ser. Jekologija i bezopasnost' zhiznedejatel'nosti. – 2011. – № 3. – S. 5–12.
  7. *Bogdanov V.D., Saharova O.V., Saharova T.G.* Issledovanie bezopasnosti i biologicheskoj cennosti suhogo koncentrata trepanga biotestirovanem // Nauch. tr. Dal'rybvтуza. – Vladivostok, 2016. – T. 37. – S. 93–98.
  8. GOST 31674–2012. Korma kombikorma, kombikormovoe syr'e. Metody opredelenija obshhej toksichnosti. – M.: Standartinform, 2013. – S. 8–10.

