

ФЕРМЕНТОЛИЗАТ ИЗ БАЛТИЙСКОЙ КИЛЬКИ *SPRATTUS SPRATTUS* КАК КОМПОНЕНТ СТАРТОВОГО КОМБИКОРМА ДЛЯ СИГОВЫХ РЫБ

А.В. Андрюхин, М.П. Андреев

ФГБНУ «АтлантНИРО», г. Калининград
andreev@atlantniro.ru

Андрюхин А.В., Андреев М.П. Ферментолит из балтийской кильки *Sprattus sprattus* как компонент стартового комбикорма для сиговых рыб // Труды АтлантНИРО. 2017. Новая серия. Т. 1, № 2. Калининград : АтлантНИРО. С. 48–55.

Представлены данные по исследованию процесса ферментативного гидролиза балтийской кильки *Sprattus sprattus*. Максимальный выход небелковых азотистых соединений достигается при внесении фермента в количестве 0,15 % массы рыбы независимо от гидромодуля. Динамики увеличения выхода продуктов гидролиза белковых веществ с увеличением продолжительности ферментолита не обнаружено. Установлены технологические параметры, способствующие получению ферментолита с химическим составом, соответствующим потребностям молоди сиговых рыб: продолжительность процесса 45 мин с момента достижения заданной температуры ферментации; гидромодуль «рыба : вода» 1 : 2, температура ферментации 45 °С, концентрация ферментного препарата 0,15 % к массе загруженного сырья и воды (с учетом разведения). Определено влияние полученного белкового компонента на рыбоводно-биологические показатели молоди европейского (балтийского) сига *Coregonus lavaretus*. Лучшие рыбоводно-биологические показатели были получены при использовании корма с включением ферментолита ФК-1 с глубиной гидролиза 41,5 %. При использовании данного образца конечная масса личинок сига была значительно (на 20–30 %) выше массы контрольной рыбы, молодь отличалась более высокими суточными приростами и имела лучшую выживаемость, что свидетельствуют о перспективности использования ферментолита как компонента для производства комбикорма для молоди европейского сига.

Ключевые слова: комбикорма, ферментолит, балтийская килька, европейский сиг, ферментолит

Andryuhin A.V., Andreyev M.P. Fermentolysat of Baltic sprat *Sprattus sprattus* as a component of starting combined feed for whitefish // Trudy AtlantNIRO. 2017. New series. Vol. 1, № 2. Kaliningrad : AtlantNIRO. P. 48–55.

Data on study of the process of enzymatic hydrolysis of Baltic sprat *Sprattus sprattus* are presented. The maximum yield of non-protein nitrogen compounds is achieved when the enzyme is introduced in the amount of 0.15 % of the fish weight, irrespective of the hydro-module. Dynamics of an increase in the yield of products of hydrolysis of protein substances with an increase in the duration of fermentolysis is not detected. Technological parameters that facilitate the production of fermentolysat with a chemical composition corresponding to the needs of juveniles of whitefishes are established: the duration of the process is 45 minutes from the moment of the fermentation temperature is reached; 1:2 hydro-module «fish : water», the fermentation temperature is 45 °С, concentration of the enzyme preparation is 0.15 % to the mass of the loaded raw material and water (taking into account the dilution). The influence of the obtained protein component on the fish-biological indicators of juveniles of European (Baltic) whitefish *Coregonus lavaretus* is determined. The best fish-biological indicators were obtained using feeds with the inclusion of fermentolysate ФК-1 with a depth of hydrolysis of 41.5 %. When using this sample, the final mass of the whitefish larvae was significantly (20–30 %) higher than that of

the control fish, the juveniles were characterized by higher daily increments and had a better survival rate, which indicates the promise of using fermentolysat as a component for the production of combined feed for European whitefish juveniles.

Key words: combined fodders, fermentolysat, Baltic sprat, European whitefish, fermentolysis

Введение

В настоящее время объем производства кормов для аквакультуры в Российской Федерации составляет около 100 тыс. т в год при потребности отрасли в комбикормах вдвое выше. Развитие российской аквакультуры ограничивается зависимостью от импорта комбикормов, что подтверждает безусловную актуальность работ по разработке отечественных кормов и их компонентов.

Негативные экономические явления последних лет, в частности девальвация рубля, привели к подорожанию кормов. Соответственно увеличилась доля их стоимости в общей структуре затрат предприятий аквакультуры. В настоящее время для российских предприятий она составляет 65 %, в то время как в странах ЕС этот показатель составляет в среднем 27 % [Глубоковский, 2015; STECF, 2014].

Большинство российских кормов не могут заменить импортные из-за низкого качества, прежде всего это выражается в низкой питательности и несбалансированном составе. Применительно к стартовым кормам для молоди сиговых рыб следует отметить, что в период смешанного питания у лососевых отмечается слабая активность пищеварительных ферментов. Переход личинок на активное питание в период резорбции желточного мешка сопряжен с массовой смертностью в период кормления, связанной с формированием пищеварительной системы, истощением запасов питательных веществ желточного мешка и низкой переваривающей способностью желудочно-кишечного тракта молоди рыб. Одно из решений данной проблемы – замена высокомолекулярных нативных белков кормов на продукты их частичного гидролиза. Ферментативные белковые гидролизаты (или ферментоллизаты) различной степени расщепления и в разных дозах вводили в стартовые корма для карповых, сиговых, осетровых и лососевых рыб [Пономарев, 1996; Патент, 2009]. Во всех экспериментах отмечали положительные тенденции в изменении основных рыбоводных показателей: выживаемость, прирост, кормовой коэффициент. Однако в данных работах не всегда учитывалось молекулярно-массовое распределение белковых фракций и продуктов гидролиза белков, состав которых должен быть максимально приближен к составу естественной пищи рыб.

В 2016 г. в лаборатории химико-технологических исследований АтлантНИРО были проведены экспериментальные работы с целью получения нового деструктурированного белкового компонента (ферментолизата) из рыбного сырья (мороженой балтийской кильки *Sprattus sprattus*), близкого по составу к естественной пище рыб, и оценка эффективности его использования в составе стартового комбикорма для ранней молоди европейского (балтийского) сига *Coregonus lavaretus* для последующего его воспроизводства.

Поставленная цель определила следующие задачи: а) установить технологические режимы производства ферментолизата из балтийской кильки, обеспечивающие химический состав, соответствующий потребностям молоди сиговых рыб; б) изучить химический состав полученных образцов ферментолизата и оценить их соответствие потребностям молоди сиговых рыб; в) определить влияние нового белкового компонента в составе стартового комбикорма на рыбоводно-биологические показатели молоди европейского (балтийского) сига.

Материал и методика

Объект исследования – ферментоллизаты из балтийской кильки, полученные с применением ферментного препарата протосубтилин ГЗХ. Отбор и подготовка проб сырья и полученной продукции выполнялись в соответствии с ГОСТ 7631.

Содержание небелкового и общего азота определяется микрометодом по Кьельдалю на приборе *Kjeltec Auto 10 SO Analyzer* (Швеция). Глубина гидролиза белков рассчитывается по отношению прироста небелкового азота в ферментализате к белковому азоту сырья. Аминокислотный состав белков в продуктах определяется после подготовки пробы на аминокислотном анализаторе *Hitachi L-8800* (Япония). Содержание липидов определяется гравиметрически по ГОСТ 7636, экстракцию липидов проводят по методу Блайя-Дайера.

Экспериментальные работы выполнялись на лабораторном оборудовании ФГБНУ «АтлантНИРО», ФГБНУ «ГосНИОРХ» и макетах полупромышленного оборудования филиала «ЭКОС» ОАО «Гипрорыбфлот» (г. Ивангород).

Для численных результатов исследований рассчитывали среднеарифметическое значение из результатов трех–пяти параллельных определений и квадратичное отклонение. Математическую обработку результатов и построение графических зависимостей проводили с использованием программы *Microsoft Excel 2007*.

Результаты

Исследования проводились в несколько этапов. Первый этап проводили в лабораторных условиях. Кильку измельчали, смешивали с водой при различном гидромодуле, составляющем 1:0; 1:0,25; 1:0,5. Далее в систему «рыбное сырье : вода» вносили ферментный препарат (протосубтилин ГЗХ), с ферментативной активностью 120 Ед/г. Концентрация фермента варьировалась в пределах 0,10–0,20 % массы рыбы. Емкость с рыбой и внесенным ферментным препаратом помещали в термостат при постоянно поддерживаемых условиях температурного оптимума действия вносимого фермента (45 °С). При данных условиях проводили процесс ферментализа в течение 20, 40 и 60 мин (табл. 1). Глубину гидролиза полученных ферментализатов оценивали по накоплению небелкового азота.

Таблица 1

Динамика накопления НБА в рыбном сырье при различных технологических режимах ферментализа, мг азота/г
Dynamics of accumulation of non-protein nitrogen in raw fish materials under various technological regimes of fermentolysis, mg of nitrogen / g

Продолжительность ферментализа	Концентрация фермента, % массы рыбы	Гидромодуль		
		1:0	1:0,25	1:0,5
20 мин	0,10	60,3±2,0	37,0±1,7	40,9±1,5
	0,15	56,0±2,7	45,5±2,2	15,3±0,7
	0,20	51,6±2,3	38,9±1,3	47,5±2,2
40 мин	0,10	60,1±2,5	48,5±1,8	35,7±1,3
	0,15	66,5±3,3	57,6±3,1	22,0±1,4
	0,20	51,2±2,1	41,6±1,4	28,7±1,1
60 мин	0,10	37,8±1,9	53,2±2,3	30,0±1,7
	0,15	55,4±3,0	49,3±2,2	30,0±1,5
	0,20	47,9±2,5	42,0±2,1	27,8±1,0

Результаты исследования динамики накопления НБА в кильке при различных условиях ферментализа свидетельствуют, что максимальный выход небелковых азотистых соединений достигается при внесении фермента в количестве 0,15 % массы рыбы независимо от гидромодуля. Дальнейшее увеличение концентрации фермента в системе не приводило к увеличению выхода НБА. При увеличении гидромодуля отмечено замедление динамики накопления НБА, что объясняется снижением концентрации ферментного препарата в смеси.

Строго направленной динамики увеличения выхода продуктов гидролиза белковых веществ с увеличением продолжительности ферментализа не обнаружено. Это, вероятно, связано с максимальным выходом продуктов гидролиза в первые минуты ферментации, в то

время как на конечных стадиях процесса гидролизу подвергаются наиболее прочно связанные пептидной связью части белковой молекулы.

Следующий этап исследований, который можно назвать производственными испытаниями, проводился на производственной базе ОАО «Гипрорыбфлот-ЭКОС», г. Ивангород Ленинградской обл. Были проведены два эксперимента, отличающиеся продолжительностью процесса ферментализа: 45 и 90 мин. По 100 кг балтийской кильки размораживали, измельчали и загружали в реактор, оборудованный паровой рубашкой для поддержания заданной температуры, где, после внесения двойного количества воды, поднимали температуру смеси до значения оптимума действия ферментного препарата (45 °С) и при постоянном перемешивании проводили собственно ферментализ с внесением фермента (протосубтилин ГЗХ) в количестве 0,15 % по отношению к массе системы «рыба : вода» в течение 45 и 90 мин (образцы ФК-1 и ФК-2 соответственно). По окончании процесса температуру внутри реактора поднимали до 95 °С для инактивации ферментного препарата, далее гидролизованное сырье через гибкий шланг подавали на вакуум-фильтр.

На вакуум-фильтре из бязевой ткани ферментированную массу за счет разницы давлений разделяли на две фракции. Первая, оставшаяся на фильтре, представляла собой концентрат белковых веществ, липидов и плотной части (кости, чешуя, кожа). Вторая фракция – водорастворимые белковые вещества, растворенные в воде продукты ферментализа белков (полипептиды, пептиды, пептоны, аминокислоты) и частично прошедшая через фильтр фракция липидов.

Фракцию, прошедшую через вакуум-фильтр, собирали в пластиковые емкости объемом по 30 л, после чего направляли на сушку на распылительной сушилке. Выход сухого продукта после сушки составлял 3–5 % в зависимости от продолжительности ферментализа. Большой выход (5 %) сухого ферментализата отмечен при проведении процесса в течение 90 мин (ФК-2). Таким образом, были получены два вида ферментализатов с разной глубиной гидролиза.

На третьем этапе был изучен общий химический состав полученных в производственных условиях образцов ферментализатов. Исследование общего химического состава (табл. 2) и состава азотистых веществ (табл. 3) продуктов ферментализа показало, что полученные образцы представляют собой высокобелковые продукты, при этом глубина гидролиза, определенная по отношению количества небелкового азота к количеству общего азота, для образцов ФК-1 и ФК-2 составляет 41,5 и 52,9 % соответственно. Доля небелкового азота по отношению к количеству белка в ФК-1 и ФК-2 составила 11,4 и 18,0 % соответственно.

Таблица 2

Общий химический состав полученных образцов ферментализата
The total chemical composition of the obtained samples of fermentolysat

Образец	Белок, %	Влага, %	Жир, %	Зола, %
ФК-1	81,6±2,7	3,9±0,3	1,1±0,1	11,6±0,5
ФК-2	80,2±3,6	4,1±0,2	1,9±0,3	11,4±0,4

Данные аминокислотного состава полученных образцов свидетельствуют о том, что после внесения в рецептуры комбикормов для молоди сиговых рыб они будут служить ценным источником незаменимых аминокислот и других протеиногенных аминокислот (табл. 4). Так, по аминокислотному скору оба образца ферментализата соответствуют потребностям рыб по 6 из 10 незаменимых аминокислот. Для ФК-1 скоры аргинина – 92, метионина – 86 и валина – 84 близки к «идеальному». Наименьший скор отмечен в отношении триптофана. Его скоры составляли 65 и 60 для ФК-1 и ФК-2 соответственно.

Для восполнения недостатка в триптофане и валине возможно использование в рецептуре комбикорма ограниченного количества кровяной муки (порядка 5 %). Количество свободных аминокислот обоих образцов ферментализата не превышало 3,3 %, что соответствует рекомендациям С.В. Пономарёва [1996] по химическому составу ферментализатов, вводимых в комбикорма для данного вида.

Таблица 3

Состав азотистых веществ полученных образцов ферментолизата
Composition of nitrogenous substances of the obtained fermentolysat samples

Образец	Общий азот, мг азота /г продукта	Небелковый азот, мг азота /г продукта	Массовая доля белка, (N _{общ.} -N _{небелк.})*6,25, %
ФК-1	130,5±8,9	54,2±2,0	47,7±1,3
ФК-2	128,3±7,7	67,9±2,4	37,8±1,1

Таблица 4

Аминокислотный состав ферментоллизатов фракций № 1 и № 2
Amino acid composition of fermentolysats of fractions No 1 and 2

Аминокислота	Потребность, %*	Массовая доля, %	
		ФК-1	ФК-2
Аргинин	3,30	3,04±1,22	2,79±1,12
Лизин	4,00	4,93±1,68	4,40±1,50
Тирозин	–	1,15±0,35	1,16±0,35
Фенилаланин	1,20	1,70±0,51	1,69±0,51
Гистидин	1,20	1,77±0,89	1,63±0,82
Лейцин и изолейцин	2,10	2,98±0,77	2,67±0,69
Метионин	1,40	1,21±0,41	0,80±0,27
Валин	2,80	2,36±0,94	2,12±0,85
Пролин	–	1,85±0,48	1,83±0,48
Треонин	1,30	2,16±0,86	2,04±0,82
0,82±0,82 Серин	–	1,85±0,48	1,82±0,47
Аланин	–	3,83±1,0	3,35±0,87
Глицин	–	2,82±0,96	2,65±0,90
Цистин	–	0,33±0,17	0,28±0,14
Аспаргиновая кислота и аспаргин	–	4,66±1,86	3,90±1,56
Глутаминовая кислота и глутамин	–	6,10±2,44	5,13±2,05
Триптофан	0,60	0,39±0,12	0,36±0,14

* по данным Склярова [2008]

Исследование фракционного состава полипептидов ферментоллизатов (табл. 5) свидетельствует, что полученный продукт обладает набором короткоцепочечных полипептидов, при этом преимущественными являются фракции размером 500–1000 Да и 150–500 Да, что говорит о достаточно глубоких гидролитических процессах, прошедших в материале. О более глубоких гидролитических процессах свидетельствует также относительно небольшое присутствие в образце ФК-2 пептидов с длиной цепочки >2500, составляющее 1,4 %, в то время как в образце ФК-1 их количество составляет 18,7 %. В образце ФК-2 основная фракция – это короткоцепочечные пептиды размером 150–200 Да (36,7 %). При этом в составе ФК-1 присутствует достаточное количество полипептидов с длиной цепочки 1000–1500 (15,8 %) и 1500–2500 (15,9 %), что обеспечивает наиболее высокие результаты кормления и выращивания молоди сиговых рыб.

Таблица 5

Распределение пептидов по молекулярной массе (дальтон), %
Distribution of peptides by molecular weight (daltons), %

Образец	Длина цепи, Да					
	>2500	1500–2500	1000–1500	500–1000	150–500	<150
ФК-1	18,7	15,9	15,8	21,1	21,2	7,4
ФК-2	1,4	7,2	12,2	28,9	36,7	13,7

Далее был изучен состав жирных кислот, входящих в состав липидов готовых образцов ферментоллизата. Во всех образцах основу составляют пальмитиновая (36,8 %) и олеиновая (36,0 %) жирные кислоты при значительно меньшей доле пальмитолеиновой кислоты (7,5 %).

Таким образом, исходя из предварительных лабораторных, производственных испытаний и исследования химического состава полученных образцов, были определены следующие технологические режимы производства ферментоллизата: а) продолжительность процесса – 45 мин с момента достижения заданной температуры ферментации; б) гидромодуль «рыба : вода» 1 : 2; в) температура ферментации 45 °С; г) концентрация ферментного препарата 0,15 % к массе загруженного сырья и воды (с учетом разведения).

На завершающем этапе, в рамках мероприятий по координации работ по проекту «Корма и кормление» по программе научного обеспечения развития аквакультуры в Российской Федерации для проведения испытаний в составе комбикормов ФГБНУ «ГосНИОРХ» были предоставлены образцы экспериментальных низкомолекулярных ферментоллизатов в количестве по 1 кг каждого.

Переданные образцы ферментоллизатов были включены ФГБНУ «ГосНИОРХ» в рецептуры трех экспериментальных кормов, в двух из них часть рыбной муки была заменена на ферментоллизат 1 и ферментоллизат 2 в количестве 5 % от рецептуры и испытана на личинках балтийского сига. Корм без добавления ферментоллизата был контрольным. Все корма были изготовлены на двушнековом экструдере. Работы проводились в Ленинградской области, в экспериментальных пластиковых бассейнах ёмкостью 40 л с круговым током воды. Подача воды была круглосуточной, полная смена воды – 3 раза в час. Средняя температура воды в период проведения опыта составляла 13,3 °С при постепенном нарастании от 8,2 до 16,7 °С.

Личинки балтийского сига были получены из икры от производителей, содержащихся в садках в оз. Суходольское Ленинградской области. В первые дни после выклева до начала питания в каждый бассейн помещали по 600 экз. личинок. Они были размещены в трех бассейнах. Кормление проводили каждый час в светлое время суток с 8 ч утра до 11 ч вечера. Для контроля за ростом молоди, получающей разные варианты кормов, и для расчета суточных рационов на следующий период, каждые 7 дней проводили контрольные обловы и взвешивания.

Включение в рецептуру корма ферментоллизата с глубиной гидролиза 52,9 % (ФК-2) не выявило преимуществ по отношению к контрольному корму (рис. 1). Все показатели были либо близки, либо ниже, чем у контрольных рыб. Это может быть связано с более глубоким

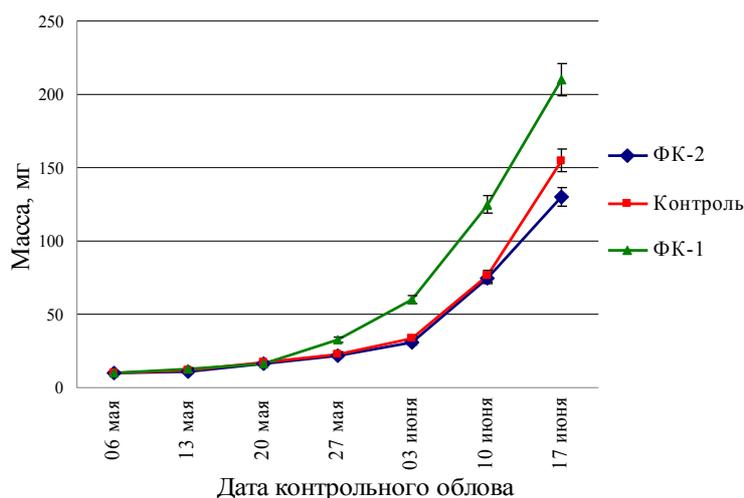


Рис. 1. Динамика роста личинок сига на кормах с ферментоллизатами

Fig. 1. Dynamics of growth of whitefish larvae on forages with fermentolizats

расщеплением белковых соединений в ферментоллизате. Лучшие рыбоводно-биологические показатели были получены при использовании корма с включением образца ФК-1 с глубиной гидролиза 41,5 % (рис. 1). При использовании данного ферментоллизата конечная масса личинок сига была значительно (на 20–30 %) выше массы контрольной рыбы, молодь отличалась более высокими суточными приростами и имела лучшую выживаемость (табл. 6). Включение ФК-1 в состав корма не повысило его питательную ценность по сравнению с контрольным кормом. Все показатели были близки к контрольным пробам (рис. 1; табл. 6).

Результаты выращивания личинок сига на кормах с экспериментальными ферментоллизатами*
Results of whitefish larvae rearing on forages with fermentolizats

Корм	5–6 мая начальная масса личинки, мг	16–17 июня конечная масса личинок, мг		Суточный прирост, %	Выход, %
		мг	в % к контролю		
С внесением ФК- 1	8,95	224±14,3	120	7,7	68
С внесением ФК- 2		176±9,2	94	7,1	57
Контроль		187±17,4	100	7,2	51

*Данные представлены ФГБНУ «ГосНИОРХ»

Изучение морфологии красной и белой крови, гистофизиологии печени не выявили у подопытных и контрольных рыб каких-то отклонений, что свидетельствует о нормальном физиологическом состоянии всей выращенной молодежи.

Обсуждение

В результате проведенных исследований были установлены рациональные технологические режимы производства ферментоллизатов из балтийской кильки *Sprattus sprattus*, позволяющие получить продукцию с заданными характеристиками по химическому составу.

Исследование химического состава полученных образцов ферментоллизатов свидетельствует, что они соответствуют потребностям ранней молодежи сиговых рыб по таким показателям, как молекулярно-массовый состав азотистых соединений, содержание аминокислот и глубина гидролиза.

Испытания экспериментальных кормовых смесей с включением в них полученных образцов свидетельствуют, что более перспективным в качестве компонента рецептуры отечественного комбикорма для молодежи сиговых рыб является образец ФК-1 с глубиной гидролиза 41,5 %. В частности, при использовании данного ферментоллизата конечная масса личинок сига была значительно (на 20–30 %) выше массы контрольной рыбы.

Достоверные различия в динамике прироста массы молодежи проявлялись после 21 суток кормления, следовательно, одно из возможных объяснений большей эффективности применения ФК-1 на данном этапе кормления по сравнению ФК-2 связано с более глубоким расщеплением белковых соединений в образце ФК-2. Это согласуется с данными о том, что у личинок сига в возрасте до 20 суток желудок отсутствует, активность протеолитических ферментов кишечника понижена и, напротив, активность ферментов желудочно-кишечного тракта у мальков и сеголеток высокая [Пономарев, 1996]. Следовательно, пищеварительная система после 20 суток в меньшей степени нуждается в низкомолекулярных продуктах гидролиза. В свою очередь, преобладающая фракция полипептидов в образце ФК-2 – это короткоцепочечные низкомолекулярные пептиды длиной цепи 150–200 Да (36,7 %), в то время как в образце ФК-1 доля этой фракции значительно ниже – 21,2%. Таким образом, преобладание короткоцепочечных полипептидов в ФК-2 ограничивает развитие молодежи на данном этапе и делает более перспективным использование в рецептуре комбикорма образца ФК-1.

Список литературы

Глубоковский М.К. О комбикормах для рыб в аквакультуре Российской Федерации 2015 // Протокол заседания общественного совета при Федеральном агентстве по рыболовству

ву № 9 от 28 октября 2015 г. С. 8–9 / Электронный ресурс: http://www.fish.gov.ru/files/documents/otkrytoe_agentsvto/obshestvennyi_sovet/protokol-9.pdf

(Патент, 2009) Пат. РФ № 2366265, 7 А23К 1/00 Способ приготовления корма для ранней молоди лососевых рыб / Мухина И.Н., Мухин В.А., Новиков В.Ю.; патентообладатель ФГБНУ «ПИНРО», з. № 2007147493/13, заяв. 19. 12. 2007; опубл. 10. 09. 2009. Бюл. № 25.

Пономарев С.В. Биологические основы кормления лососевых рыб в раннем постэмбриогенезе. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1996. С. 15–16

Скляр В.Я. Корма и кормление рыб в аквакультуре. М.: ВНИРО, 2008. 32 с.

(STECF, 2014) Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) – The economic performance of the EU aquaculture sector (STECF 14–18). 2014. 48 p.