

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»

На правах рукописи

Горбунков Михаил Владимирович

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА И ПРИМЕНЕНИЕ
ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА «ПРОТЕПСИН»
ДЛЯ ОБРАБОТКИ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Специальности: 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ
05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, профессор
Л.В. Антипова

Воронеж – 2016

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Рынок ферментных препаратов.....	12
1.2. Источники, номенклатура и способы получения ферментов.....	20
1.3. Ферментные препараты в практической деятельности человека.....	30
ГЛАВА II. УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	47
2.1. Характеристика объектов исследования.....	47
2.2. Методы исследований.....	48
2.3. Схема и условия проведения экспериментальных исследований.....	69
ГЛАВА III. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА «ПРОТЕПСИН».....	72
3.1. Общая характеристика ферментного препарата «Протепсин».....	73
3.2. Исследование фракционного состава протеолитического комплекса ферментного препарата «Протепсин».....	75
3.3. Исследование влияния рН и температуры на активность и стабильность ферментов протеолитического комплекса препарата «Протепсин».....	79
3.4. Определение молекулярной массы и аминокислотного состава.....	85
протеаз препарата «Протепсин».....	85
3.5. Идентификация функциональных групп активного центра протеолитических ферментов.....	89
3.6. Субстратная специфичность протеолитических ферментов препарата «Протепсин».....	94
ГЛАВА IV. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ПРОТЕПСИН» НА СВОЙСТВА МЯСНОГО И МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ.....	99
4.1. Микроструктурные и функционально-технологические свойства обработанного ферментами мясного сырья.....	99
4.2. Количественная характеристика микрофлоры мяса в процессе ферментной обработки.....	106
4.3. Цветность мясных фаршей в зависимости от сорта и ферментной обработки говядины.....	108
4.4. Перевариваемость исследуемых мясных систем.....	110
4.5. Действие препарата «Протепсин» на белки молока.....	111

ГЛАВА V. ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА «ПРОТЕПСИН» В ТЕХНОЛОГИЯХ МЯСНЫХ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ.....	118
5.1. Применение ферментного препарата «Протепсин» для обработки сырья мясного происхождения.....	120
5.1.1. Обобщенная характеристика препарата применительно к технологиям обработки мясного сырья.....	120
5.1.2. Применение препарата «Протепсин» для интенсификации процессов созревания мяса.....	127
5.1.3. Применение ферментного препарата «Протепсин» для предварительного посола мороженого блочного мяса.....	132
5.1.4. Применение препарата «Протепсин» для улучшения свойств субпродуктов.....	134
5.1.5. Частные технологии мясопродуктов с применением препарата «Протепсин».....	135
5.2. Способ производства мясных продуктов с применением ферментной обработки сырья и плазмы крови убойных животных.....	138
5.3. Исследование возможности использования препарата «Протепсин» в технологии приготовления сыров.....	143
5.4. Получение белковых гидролизатов молочной сыворотки.....	144
ВЫВОДЫ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	152
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	169

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования. Использование ферментных технологий во многом определяет успех развития большого числа современных отраслей экономики, в том числе и пищевой промышленности. Создание и внедрение инновационных технологий позволило в значительной степени расширить сферу применения ферментных препаратов. Сегодня ферменты помогают улучшить качество продукции, повысить ее безопасность, увеличить эффективность технологических процессов, сократить производственные издержки и снизить антропогенное воздействие на окружающую среду. Совокупность этих факторов входят и в сферу государственных интересов. Так, на сегодняшний день реализуется «Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года», утвержденная постановлением Правительства Российской Федерации № 1853 п-П8 от 24 апреля 2012 г., в разделах которой отражено приоритетное значение расширения производства и внедрения ферментных препаратов: раздел 3. «Промышленная биотехнология» содержит пункт 3.1. «Производство ферментов»; раздел 5. «Сельскохозяйственная биотехнология» содержит пункт 5.9. «Биотехнологические компоненты кормов и премиксов»; раздел 6. «Пищевая биотехнология» содержит пункт 6.2. «Ферментные препараты», пункт 6.5. "Пищевые ингредиенты, включая витамины и функциональные смеси" и пункт 6.6. "Глубокая переработка пищевого сырья".

Объем рынка ферментных препаратов в РФ в 2013 году оценивался в 183 млн. долларов с прогнозируемым ежегодным темпом роста в 10% и по прогнозам компании «Frost&Sullivan» к 2019 году может достигнуть 297 млн. долларов. Однако, на сегодняшний день промышленная база по получению ферментов практически отсутствует, а собственное производство составляет не более 3 тыс. тонн, при этом порядка 10 тыс. тонн импортируется. Основной

объем отечественного производства приходится на ферментные продукты для спиртовой промышленности [1]. Таким образом, развитие научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ в области ферментных препаратов является не только достаточно привлекательной с точки зрения науки, но и важной государственной задачей импортзамещения, которая обозначена в Послании Президента РФ В.В. Путина Федеральному Собранию РФ в 2015 году.

Особое значение имеют протеолитические ферментные препараты, так как они связаны с превращением белковых веществ – главного компонента пластического обмена человека и животных. Именно они составляют самый крупный сегмент мирового рынка ферментов, и именно с их использованием осуществляется поиск новых источников и форм белковой пищи. Протеазы катализируют гидролиз пептидных связей и наряду с большим прикладным значением играют важную роль в метаболизме, изучение которого является важной фундаментальной задачей.

В условиях дефицита мясного сырья, производства мясных ресурсов низкой сортности, видовой ограниченности, необходимости привлечения нетрадиционных источников и их комбинирования, а также роста объемов мясного сырья с признаками PSE, DFD и RSE, значение ферментных технологий, связанных с трансформацией и деструкцией сложных белковых систем, значительно возрастает. Аналогичные проблемы могут быть разрешены с помощью ферментов в молочной и рыбной промышленности.

Степень разработанности темы

В теорию и практику разных аспектов ферментативной обработки сырья животного происхождения внесли вклад работы многих российских и зарубежных ученых (Л.В. Антипова, В.Г. Боресков, А.С. Большаков, Л.А. Бушкова, А.А. Васильев, Н.К. Журавская, Н.Н. Крылова, Л.С. Кудряшов, Н.Н. Липатов, Е.Ф. Орешкин, Д.В. Павлов, П.Е. Павловский, И.А. Рогов, И.А.Смородинцев, В.И. Соловьев, А.А. Соколов, VickieVaclavik, Elizabeth W. Christian, Yu-ZhongZhang, FidelToldra, SaroatRawdkuen, Dima N. Felicia и др.)

Однако практическое внедрение ферментных технологий нельзя признать удовлетворительным особенно в таких производящих и перерабатывающих отраслях АПК как мясная, молочная, рыбная. Положение дел связано как с недостатком объемов производства и ограниченным ассортиментом ферментных препаратов, так и необходимостью научного обоснования новых технических решений. Несмотря на значительное отставание в объемах производства, на внутреннем рынке появились производители протеолитических ферментных препаратов, в том числе ЗАО «Завод эндокринных ферментов» (п. Ржавки, Зеленоградский район, Московская область), ООО ПО "Сиббиофарм" (Новосибирская область, г. Бердск) и ОАО «Московский завод сычужного фермента» (г. Москва). Однако свойства и возможности рационального использования их продукции изучены недостаточно. В 2014 году введено в эксплуатацию новое предприятие по выпуску ферментных препаратов – ООО «Агрофермент» (Тамбовская область), которое производит ферменты для кормов и имеет возможность перенастроить производство для нужд спиртопроизводства, хлебопечения, молочных продуктов, целлюлозно-бумажной, текстильной промышленности, однако на сегодняшний день в их ассортименте протеолитических ферментных препаратов не значится.

Тем не менее, ферментный препарат «Протепсин» активно позиционируется производителем как полезный для обработки сырья животного происхождения. Учитывая результаты предварительно проведенных исследований, представляет значительный интерес к препарату для разрешения реальной ситуации с дефицитом сырья в мясной и молочной промышленности.

Цель диссертационного исследования состоит в развитии ферментных технологий обработки низкосортного и маловостребованного сырья животного происхождения для увеличения ресурсного потенциала пищевых продуктов и интенсификации технологических процессов.

В рамках поставленной цели решались подчиненные ей **задачи:**

- идентифицировать протеолитические ферменты в составе комплекса препарата «Протепсин»;
- исследовать области активности и стабильности протеолитических ферментов;
- определить молекулярную массу, аминокислотный состав и функциональные особенности протеолитических фракций комплекса;
- установить функциональные группы каталитического центра и специфичность действия при гидролизе белков и пептидов;
- проанализировать действие препарата «Протепсин» на мясные системы;
- исследовать действие препарата «Протепсин» на белки молока;
- обосновать направления применения препарата и условия ферментных технологий обработки мясных ресурсов;
- исследовать возможность использования ферментного препарата «Протепсин» при обработке молочного сырья;
- провести опытную и производственную апробацию ферментных технологий, разработать техническую документацию и оценить и оценить экономическую целесообразность технических решений.

Научная новизна. Впервые установлен фракционный состав протеолитического комплекса препарата «Протепсин», идентифицировано методами электрофореза и хроматографии два протеолитических фермента, отличающиеся физико-химическими и биохимическими свойствами. Кинетика термической и кислотной инактивации ферментов описывается уравнением реакции первого порядка и указывает на область стабильности ферментов в области кислых значений рН (3,0-5,5) и температурах 40-55°C. Электрофоретически и хроматографически доказано, что ферменты отличаются подвижностью в электрическом поле, величиной поверхностного заряда, молекулярной массой (71800-протеиназа I и 34500 – протеиназа II). Общая протеолитическая активность характерна для обоих ферментов, но молокосвертывающую активность проявляет лишь протеиназа II. Применение независимых критериев оценки (расчет теплот ионизации для

«кислой» и «щелочной» ветви кривой $A=f(pH)$, фотоокисление, действие ионов металлов и т.д.) позволило выявить, что в активный центр ферментов входят несколько карбоксильных групп и, возможно, ароматический радикал аминокислоты. Протеиназы проявляют субстратную специфичность при гидролизе белков и пептидов, преимущественно разрывая связи, образованные гидрофобными и ароматическими радикалами. Состав аминокислот в структуре белков-ферментов представлен значительной долей гидрофобных аминокислот (около 50 % всех остатков), превалируют количественно глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, что соответственно подчеркивает роль гидрофобных взаимодействий в стабилизации пространственной структуры и объясняет область биохимической активности в кислой зоне рН.

Препарат «Протепсин» универсален по действию на мясные и молочные белки, гидролизует мышечные и соединительнотканые белки. Проявляет широкую специфичность при гидролизе казеина молока.

Физико-химические и биокаталитические свойства протеолитических ферментов препарата обосновывают рациональные пути привлечения малоиспользуемого мясного и молочного сырья для увеличения ресурсного потенциала пищевых продуктов и интенсификации технологических процессов.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретические положения и научные результаты значительно расширяют знания в области прикладной энзимологии, которые внедрены в практику научных исследований и образовательную деятельность при подготовке кадров соответствующего уровня (бакалавры, магистры) по направлению УСП «Промышленная экология и биотехнология».

Обоснованы, апробированы и рекомендованы ферментные технологии обработки сырья животного происхождения для увеличения ресурсного потенциала пищевых продуктов за счет вовлечения в рецептурные решения мясного сырья с высокой массовой долей соединительнотканых включений (10-100%). Сформированы подходы к выбору объектов для внедрения

ферментных технологий, разработаны условия, параметры и режимы реализации частных технологий.

Практическая значимость состоит в развитии научных представлений прикладной энзимологии, обосновании и внедрении новых технических решений по использованию ферментных технологий для стабилизации ресурсного потенциала мясной и молочной отраслей за счет имеющихся внутрипроизводственных резервов и их глубокой переработки. Теоретические положения и научные результаты значительно расширяют знания в области биотехнологического потенциала ферментных технологий, которые рекомендуется внедрить в практику научных исследований и образование при подготовке кадров по направлению «Промышленная экология и биотехнологии».

Предлагаемые технические решения находятся в стадии НИОКР или внедрены в реальное производство на ряде предприятий мясной отрасли. Сформированы подходы к выбору объектов для внедрения ферментных технологий, разработаны условия, параметры и режимы реализации ряда частных технологий.

Новизна технических решений подтверждена заявками на патенты РФ (заявка №201514756/13(073256); №2015147566/13(073255)), и их значимость – результатами апробаций и внедрением в реальное производство с доказательством экономической целесообразности .

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационного исследования является обобщение информации и системный анализ опыта разработки и применения ферментных технологий в мясной и молочной отраслях АПК, составление схемы экспериментальных исследований на принципах причинно-следственных связей и логики в развитии этапов с применением современных методов анализа, включая инструментальные и специальные: 1. Обоснование выбора основного объекта – ферментного препарата «Протепсин» отечественного производства протеолитического действия; 2. Идентификация ферментов протеолитического комплекса,

исследование физико-химических и биокаталитических свойств, структурных особенностей; 3. Оценка действия ферментов препарата на белки мяса и молока на реальных субстратах; 4. Обоснование направлений и реальное использование ферментных технологий для увеличения ресурсного потенциала, расширения ассортимента и интенсификации производства продуктов на частных примерах.

Научные положения, выносимые на защиту:

- состав протеолитического комплекса препарата «Протепсин» и физико-химическая характеристика входящих ферментов;
- биокаталитические особенности и субстратная специфичность ферментов протеолитического комплекса при действии на белки и пептиды;
- ферментные технологии обработки мясного и молочного сырья;
- ассортиментные линейки пищевых продуктов с использованием маловостребованного мясного сырья при интенсификации технологических процессов.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность полученных в диссертации результатов подтверждается: 1) уровнем экспериментальных исследований с использованием современных методов исследований и приборно-измерительной техники; 2) использованием классических законов естественных наук и применением методов математической статистики при обработке экспериментальных данных; 3) воспроизводимостью и адекватностью теоретических и экспериментальных результатов; 4) широкой апробацией результатов в реальном производстве и научной общественности.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международном, российском и региональном уровнях, в том числе на внутривузовских отчетных конференциях ВГУИТ в период 2013-2016 гг.: X Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы химии, биологии и биотехнологии (2016)»; VIII Международный научно-практический симпозиум «Перспективные ферментные препараты и

биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов»; Международная научно-техническая конференция «Инновационное развитие техники пищевых технологий» (Воронеж, ВГУИТ, 2015); конференция «Системный анализ и моделирование процессов управления качеством в инновационном развитии агропромышленного комплекса» (Воронеж, ВГУИТ, 2015); Международная научно-техническая конференция «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение» (Воронеж, ВГУИТ, 2015 г.) и выставочных центрах (Экспоцент, Международный конкурс в номинации «Лучшие добавки и ингредиенты для агропромышленного комплекса», Агропродмаш, октябрь 2013 г.).

Результаты отмечены сертификатами участника, дипломами и медалями выставочных центров.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Рынок ферментных препаратов

Двадцать первый век ознаменовался бурным развитием биотехнологии. Объем мирового рынка биотехнологий по оценке компании «Frost & Sullivan» на конец 2014г. – начало 2015 года оценивался в 270 млрд. долларов, а прогнозируемые темпы роста ее рынка составляют 10-12% в год до 2020 года. Таким образом, ожидается, что объем рынка вырастет более, чем в два раза и составит около 600 млрд. долларов к 2020 году. Анализируя отраслевую сегментацию, можно отметить, что на биофармацевтику приходится около 60% объема мирового рынка, на промышленные биотехнологии, в т.ч. биоэнергетику – около 35%, на агробiotехнологии и на природоохранные биотехнологии – оставшиеся 5% объема мирового рынка [1].

В географическом разрезе, на долю США приходится около 40% объема мирового рынка, также значительную долю занимают производители Европы (Франция, Германия, Дания, Швейцария и Швеция), Канады и Австралии. Однако, ожидается, что наиболее быстрорастущими биотехнологическими рынками в ближайшие 5 лет станут страны Азиатско-Тихоокеанского региона, в частности Китай и Индия, где существует огромный потенциал развития отрасли. Доля России на мировом рынке составляет менее 0,1% (рис. 1.1).

Сектор промышленных биотехнологий является в настоящий момент мощным двигателем развития биоэкономики в мире, и по оценкам компании Frost & Sullivan, в ближайшие годы темпы ее роста рынка обгонят темпы сельскохозяйственной и фармацевтической биотехнологий. Это связано с тем, что в результате биологического синтеза можно создавать большое количество новых продуктов, как в традиционных областях (продукты питания, корма для животных и т.д.), так и в принципиально новых (биополимеры, биоразлагаемые продукты). Благодаря использованию биотехнологий в промышленных

процессах можно добиться улучшения технологических показателей и характеристик продукта, обеспечить экономию энергии, комплексную переработку отходов, а также снижение действия антропогенного фактора на окружающую среду [1].



Рисунок 1.1– Географическое распределение направлений и отраслей биотехнологии (по данным аналитической компании Frost & Sullivan 2014 «Обзор рынка биотехнологий в России и оценка перспектив его развития») [1]

По состоянию на 2012 год, объем российского рынка промышленных ферментных препаратов оценивался в 183 млн. долларов, с прогнозируемым ежегодным темпом роста в 10% (рис. 1.2).

В России промышленная база по получению ферментов ничтожно мала и способна обеспечить потребности внутреннего рынка менее, чем на четверть, что составляет менее 3 000 тонн, при этом импортируется порядка 10 000 тонн ферментных препаратов. Специфика российского рынка заключается в том, что практически отсутствуют компании, производящие товарные ферменты.

Основной объем отечественного производства приходится на ферментные продукты для спиртовой промышленности, которые производят спиртовые предприятия для собственных нужд.



Рисунок 1.2 – Диаграмма прогноза роста рынка промышленных ферментов с 2012 по 2019 годы [1]

До недавнего времени единственным крупным производителем товарных ферментных препаратов в России являлось ООО «ПО Сиббиофарм». Компания специализируется на производстве ферментов для кормо- и спиртопроизводств, а также для кожевенной и текстильной промышленности. Предприятие ежегодно увеличивает объем выпуска, и в настоящее время производит порядка 1 тыс. тонн ферментов в год. Росту производства способствует, как растущий внутренний спрос, так и значительный экспортный потенциал. Из других предприятий, которые ориентированы на выпуск, главным образом, пищевых ферментов следует отметить ОАО «Московский завод сычужного фермента», ЗАО «Завод эндокринных ферментов» (ферменты для ветеринарии, мясной и молочной промышленности). В 2014 году впервые за долгие годы в России, в Тамбовской области было введено в эксплуатацию новое предприятие по выпуску ферментных препаратов – ООО «Агрофермент» - мощностью в 1000 тонн в год. Основная продукция компании – ферменты для кормов, призванные повысить их конверсию, ускорить рост животных, снизить экологическую

нагрузку за счет уменьшения количества отходов кормовых предприятий. Новый завод располагает возможностью перенастроить мощности для производства любого фермента для других отраслей: спиртопроизводства, хлебопечения, молочных продуктов, целлюлозно-бумажной, текстильной промышленности. «Агрофермент» использует разработки (штаммы микроорганизмов) ученых МГУ им. М.В. Ломоносова (г. Москва), Института Биохимии им А.Н. Баха РАН (г. Москва) и Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (г. Пущино, Московская область). Компания рассматривает возможности для расширения производства микробов, используемых в процессе производства ферментов, путем создания технопарка на базе Мичуринского государственного аграрного университета. Однако, стоит отметить, что Российский рынок ферментов сохраняет высокую зависимость от импорта: на иностранные поставки приходится до 80 % кормовых ферментных препаратов и 100% ферментов для бытовой химии. В России уже много лет представлена продукция ведущих биотехнологических компаний мира, но ни одна из этих компаний не организовала свое производство в России. Крупнейшим поставщиком ферментов на российский рынок является датская компания Novozymes (46% рынка, из которых 26% приходится на долю ферментов для пищевой промышленности) и Danisco, Biozym, Alltech, ShandongLongdaBio-ProductsCo, Genzyme, Roche, BASF, DSM и др. занимают оставшуюся часть российского рынка ферментных препаратов.

В структуре потребления преобладают ферменты для бытовой химии: на долю сегмента приходится 37% (в денежном выражении) в общем объеме потребления ферментов. Многие иностранные компании работают напрямую с российскими и иностранными производителями моющих средств. Так, Biozym поставляет ферменты для ООО «Хенкель Рус», Novozymes – для Procter&Gamble, Danisco – для Procter&Gamble, ОАО «Невская косметика».

Опережающими темпами растет потребление ферментов в сельском хозяйстве. Если в 2009 году на этот сегмент приходилось 16%, то в 2013-2015 году – уже более 30%. Данный факт обусловлен не только общим увеличением

поголовья скота, но также и необходимостью интенсификации животноводства. В то же время, Россия отстает от развитых стран по потреблению инновационных ферментных препаратов в ряде отраслей. Так, значительный потенциал роста имеется в пищевой промышленности, в частности в хлебопечении, масложировой и мясной промышленности.

По данным аналитического агентства GIA, мировой рынок промышленных ферментов имеет все шансы достигнуть объема 3,9 млрд. долларов США в денежном выражении уже к концу 2017 года, что практически вдвое будет превышать уровень их производства в 2011 году. Рост спроса будет обусловлен расширением возможностей их применения, в первую очередь, в комбикормовой промышленности, ужесточением требований к безопасности продукции со стороны ведущих стран-производителей, а также ростом поставок в развивающиеся страны [2].

В 2012 году Европа была лидером на мировом рынке ферментов с совокупной долей в 46% от общего объема оборота. За ней следовали Азиатско-Тихоокеанский регион (23%) и Северная Америка (21%). По оценкам экспертов, рынок растет сегодня быстрыми темпами, причем количество компаний и предлагаемых продуктов увеличивается столь же быстро, что и объем продаж. По мнению аналитиков, рост фитазы и не крахмальных полисахаридов является одним из главных факторов, ответственных за столь быстрое расширение рынка. Европа и Азиатско-Тихоокеанский регион будут доминировать на мировом рынке в ближайшие годы, поскольку спрос на кормовые ферменты здесь растет устойчиво [3].

Основная часть ферментов, поступающих на мировой рынок, приходится на долю гидролаз, из которых 60% составляют пептидгидролазы (в основном щелочные и нейтральные), использующиеся в качестве детергентов в производстве синтетических моющих средств, а 30% - гликозидазы, применяющиеся в производстве кондитерских изделий, фруктовых и овощных соков.

Как уже отмечалось выше, в России недостаточно развито собственное производство ферментных препаратов. По данным аналитических служб, объем отечественного рынка ферментов составляет около 14 млн. тонн, при этом на долю отечественного производства приходится не более 3 млн. тонн. В агропромышленном секторе эта цифра значительно выше, так как основными потребителями отечественных ферментов и ферментных препаратов являются спиртовая промышленность и кормопроизводство. По оценкам аналитиков, до 80% ферментных препаратов, необходимых для животноводства, импортируется из-за рубежа. Остальные отрасли пищевой промышленности предпочитают использовать исключительно зарубежные ферменты. Это связано, в первую очередь, с отсутствием масштабного производства, что в свою очередь связано с недостаточной или полностью отсутствующей научной базой [3].

В настоящее время на Российском рынке присутствует продукция практически всех мировых лидеров рынка ферментных препаратов:

- компания «Novozymes» продает свою продукцию как через официальное представительство, так и через дистрибьюторов, например, фирму «Пищепромпродукт», поставляющую ферментные препараты компании «Novozymes» для хлебопекарных и кондитерских предприятий [4];

- нидерландская компания «DSMFoodSpecialties» поставляет молокосвертывающие ферменты «Фромаза» и «Максирен» через дистрибьютора ТД «Антагро» [4];

- датская компания «Chr.Hansen», специализирующаяся на рынке молочной продукции уже более 130 лет, производит и реализует универсальный сычужный фермент для производства сыра и по праву ее продукция занимает лидирующие позиции на рынке сыров [5].

Наряду с корифеями ферментного рынка, заметные обороты набирает немецкая фирма ABEzymes, в которую вошла компания GammaChemie, продукция которой использовалась в дистилляции, пивоварении, производстве соков и вина. Среди Российских дистрибьюторов продукцию ABEzymes для

всех отраслей пищевой промышленности продают ТД «Гермес-Р» (Московская область), ООО «Флори» (Ростовская область) [6].

Финская компания SixLtd., специализирующаяся на производстве смесей специй и пищевых добавок, предлагает на российском рынке ферментные препараты на основе транsgлютаминазы для производства мясных изделий, дистрибьютором по Уральскому региону является Компания «ИНБУКО» [7], а по центральному региону – группа компаний "Биопродукт Маркет" [8].

Препараты голландской фирмы CSKfoodenrichment в центральном регионе представляет «Компания Павлов», в частности, они предлагают натуральный молокосвертывающий фермент Kalase и микробиологический заменитель сычужного фермента Milase [9].

Британская компания Biocatalysts недавно представила новый фермент для выпечки, сделанный, что не маловажно, без использования генетической модификации. По словам управляющего отделом маркетинга компании Biocatalysts Каролин Вест, предлагая на рынок не генетически измененную продукцию, компания позволяет производителю сделать выбор, что применять – ГМ-ферменты или природные энзимы.

Наряду с европейскими лидерами по производству ферментов все чаще на рынке появляются фирмы из Индии, Южной Кореи, Тайваня, Китая, что, несомненно, связано с повышением спроса. Так, компания «ХимПартнеры» - российское подразделение индийско-китайско-российского холдинга «ProParthners», специализирующегося на международной торговле сырьевыми материалами, поставляет ферменты индийского производства для многих отраслей пищевой промышленности (пивоваренной, хлебобулочной, соковой, чайной и др.) [10].

Во многих европейских странах, доминирующим на рынке применения пищевых ферментов является хлебопечение – половину продаваемых препаратов составляют ферменты для производства хлеба, как наиболее эффективные и безопасные технологические средства [11]. В России совсем

другая ситуация – применение ферментов в хлебопечении еще недостаточно сильно развито.

В России наибольшее количество ферментных препаратов поступает в пивоваренную отрасль, и у нас этот показатель выше, чем в Европе. Потребление пива в стране остается достаточно высоким, требования к сырью возрастают, а качество местного сырья, как правило, не соответствует технологическим требованиям. Стоимость качественного импортного солода и ячменя за последние два года значительно выросли в связи с обвалом курса рубля к европейской валюте. А качественного ячменя и солода внутри страны производится не много, поэтому для работы с недорогим сырьем, используют ферментные препараты, что обходится дешевле, чем закупка импортного сырья [12].

По мнению директора российского представительства датской компании Novozymes Николая Сычева, помимо пивоварения, в России только две отрасли, которые более или менее широко используют ферменты – это спиртовая и производство соков из плодоовощного сырья. Крахмалопаточная промышленность, по мнению Сычева, в России еще не достаточно развита, но потенциал для этого имеется, и, по всей вероятности, объем потребления ферментов будет расти с ростом основного производства [13].

Во всем мире уровень применения ферментов повышается с развитием и внедрением современных инновационных технологий. Что касается инновационных технологий, то, как считает Сычев, Россия более консервативна, по сравнению с европейскими странами, «поэтому мы отстаем от Запада по потреблению ферментных препаратов» [14]. Так, например, в масложировой промышленности технологии использования ферментов только начинают внедряться. Такая же примерно ситуация наблюдается и в хлебопечении, и в мясной промышленности. Но жизнь диктует свои законы и стремление людей к здоровому образу жизни, а значит, и потреблению здоровой и функциональной пищи, заставляет производителей постепенно наращивать обороты своего производства с использованием инновационных

технологий, позволяющих использовать различные пищевые ингредиенты, в том числе и ферменты определенного, направленного действия.

Некоторое время назад, для России основная доля экспорта приходилась на реэкспортируемые ферменты и ферментные препараты (до 20% от общего объема). Основными направлениями экспорта оставались и остаются страны СНГ, прежде всего Беларусь, на долю которой приходится до 70% объема экспортных поставок. Вторым по значимости импортером ферментных препаратов является Казахстан, в который ежегодно экспортируется до 60 тонн, что составляет до 20% физического объема экспорта. В структуре экспорта основная доля приходится на ферментные препараты для пищевой промышленности, прежде всего для производства спирта и слабоалкогольных напитков. Таким образом, отечественный выпуск ферментных препаратов реально не удовлетворяет не только потребности экспорта, но и потребности внутреннего рынка. Наименее обеспеченными ферментными препаратами являются мясная и рыбная промышленности, что в свою очередь, сказывается на экономических характеристиках производства и в первую очередь на цене.

1.2. Источники, номенклатура и способы получения ферментов

Ферменты (энзимы) – это биокатализаторы, т.е. вещества биологического происхождения, ускоряющие химические реакции. Термин ферменты происходит от греческого «fermentation» (брожение). Подавляющее число ферментов – вещества белковой природы [15]. Уже на заре цивилизации люди знали способы приготовления хлеба, вина, пива, сыра, различных соусов, в которых основную роль играют процессы брожения, т.е. процессы вызываемые микроорганизмами и выделяемыми ими ферментами, а промышленное производство ферментов началось более 100 лет назад и основывалось на извлечении ферментов из сырья растительного или животного происхождения.

И только 50 лет назад начали активно применять микроорганизмы в качестве их продуцентов.

В настоящее время – эпоху бурного развития биотехнологии и генной инженерии, сделало ферментные препараты незаменимым участником многих пищевых технологий. Их использование позволяет увеличить скорость технологических процессов, ощутимо повысить выход готовой продукции, улучшить ее качество, экономить сырье, снизить количество отходов, понизить производственные издержки без потери качества конечного продукта. Для получения ферментных препаратов пищевого назначения используются органы и ткани сельскохозяйственных животных, культурные растения, специальные штаммы микроорганизмов. Таким образом, по происхождению и виду сырья ферментные препараты разделяются на три группы:

1. Ферментные препараты растительного происхождения.

Классически извлекаются из папайи, инжира, ананаса, а так же представлены солодом и препаратами на его основе. Папаин и его модификации являются наиболее применяемыми в производстве ферментами протеолитического действия, и ускоряют процесс гидролиза пептидных связей в молекулах белков и их производных. Папаин и химопапаин - ферменты латекса плодов дынного дерева (папайи) (*Carica papaya*) достаточно изучены вплоть до пространственной структуры (рис. 1.3), что дало возможность создать стабильные технологии в мясной отрасли.

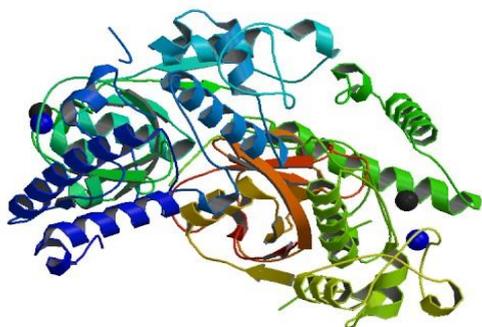


Рисунок 1.3– Трехмерная структура модифицированного папаина I86F полученная с использованием рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.98 Å. [16]

Фицин выделяют из млечного сока растений семейства тутовых рода фикусовых, например, инжира (*Ficus carica*). Фермент бромелаин получают из свежего сока ананаса (*Ananas comosus*, *Ananas bracteatus*) - соплодия травянистого растения семейства *Bromeliaceae*. Солод - это искусственно пророщенное зерно при определенных температуре и влажности. В процессе прорастания в зерновке активизируются ферментные системы, находящиеся до этого в зимогенном состоянии. Эти изменения создают в солодовом зерне мощную ферментную систему, содержащую ферменты широкого спектра действия, в основном гидролазы (амилазы, протеазы, липазы, цитазы и т.д.) [17].

2. Ферментные препараты животного происхождения.

Их выделяют из различных отделов желудочно-кишечного тракта животных и по сути – это пищеварительные ферменты. Вырабатывают сычужный фермент, пепсин (куриный, говяжий, свиной), трипсин, химотрипсин. Все они являются протеолитическими ферментами. Сычужный фермент от слова «сычуг» (сычужок) - засоленный и высушенный желудок жвачных животных, имеет два активных компонента: химозин и пепсин. Химозин (ренин) - это гидролаза, вырабатываемая желудочными железами жвачных животных (железами сычуга 4-го отдела желудка). Основным источником ренина природного происхождения являются желудки молочных телят, ягнят, козлят, возраст которых не более 10 дней. В более позднем возрасте, одновременно с ренином вырабатывается значительное количество пепсина, который ухудшает свойства сычужного фермента. Пепсин в чистом виде это - фермент, выделяемый в желудках млекопитающих, который сворачивает молоко для лучшего его усвоения. По действию это - эндопептидаза, то есть фермент, который расщепляет пептидные связи в молекулах белков и пептидов. Пепсин – один из первых ферментов, пространственная структура которого была расшифрована (рис. 1.4), что дало, соответственно, успешно реализовать технологии его применения в медицине и пищевой промышленности.

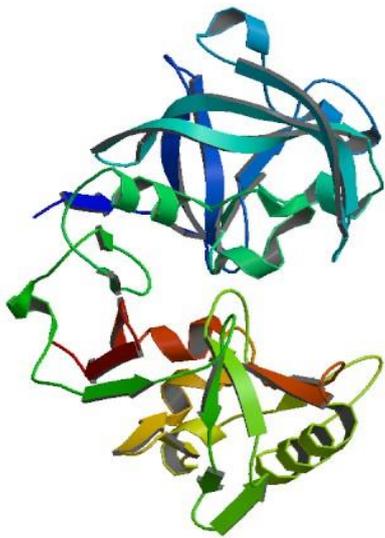


Рисунок 1.4 – Трехмерная структура человеческого пепсина полученная с использованием рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.61 Å [18]

Трипсин и химотрипсин - получают из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Катализируют гидролиз белков и пептидов, в виде неочищенного панкреатина находят некоторое применение в пищевой промышленности для производства гидролизатов, а также в медицине. Ферментные препараты животного происхождения обладают молокосвертывающим свойством, поэтому применяются, например, в сыроделии. Раньше, сыр делали именно с применением кусочков засоленных и высушенных сычужков, которые клали в молоко для его сворачивания. Нужно отметить, что в некоторых местах так делают и до сих пор - например, в горных селениях Кавказа. Данный вид ферментов представляет большой интерес для расширения ассортимента белковых молочных продуктов различного назначения.

3. Ферментные препараты микробного происхождения.

Такого рода препараты получают при культивировании специфических микроорганизмов - продуцентов, способных вырабатывать определенные ферменты. В настоящее время в качестве продуцентов в промышленности используют бактерии и плесневые грибы в специальных аппаратах – биореакторах (ферментерах) в жестко контролируемых условиях. Различают ферментные препараты бактериальные, полученные путем глубинного

культивирования бактерий, и грибные, полученные путем поверхностного культивирования микроскопических грибов.

Международный союз биохимии и молекулярной биологии в 1961 году предложил систематическую номенклатуру, согласно которой все ферменты разделены на классы в зависимости от типа катализируемой химической реакции. Каждый класс состоит из многочисленных подклассов с учетом преобразуемой химической группы субстрата, донора или акцептора преобразуемых группировок, наличия лигандов и т.д. [15,19]. Эта классификация актуальна и на сегодняшний день, включает 6 классов ферментов:

I класс – Оксидоредуктазы - катализируют окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Класс насчитывает 22 подкласса. Коферментами этого класса являются НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, убихинон, глутатион, липоевая кислота. Примером подклассов могут служить ферменты, действующие на -СН-ОН-группу доноров, на -СН-СН-группу доноров, на -СН-NH₂-группу доноров, на гемсодержащие доноры;

II класс – Трансферазы - катализируют реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор), участвуют в реакциях взаимопревращения различных веществ, обезвреживания природных и чужеродных соединений. Коферментами являются пиридоксальфосфат, коэнзим А, тетрагидрофолиевая кислота, метилкобаламин. Класс подразделяется на 9 подклассов, в зависимости от строения переносимых групп. Примером подклассов являются ферменты, переносящие одноуглеродные фрагменты, альдегидные или кетоостатки, ацильные остатки, азотсодержащие группы, фосфорсодержащие группы. Часто встречается рабочее название трансфераз – киназы. Это трансферазы, катализирующие перенос фосфата от АТФ на субстрат (моносахариды, белки и др), т.е. фосфотрансферазы;

III класс – Гидролазы - осуществляют разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов H_2O , подразделяются на 13 подклассов. Ввиду сложности многих субстратов, у ряда ферментов сохранены тривиальные названия, например, пепсин, трипсин. Коферменты отсутствуют. Гидролазы широко представлены ферментами желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, липаза, амилаза и другие) и лизосомальными ферментами. К последним относятся тканевые ферменты – катепсины, локализующиеся в лизосомах мышечного волокна, им отводится большое значение при посоле и созревании. Закономерности их воздействия на белки мышечной ткани имеют большое практическое значение и учитываются при дополнительном внесении ферментов той или иной специфичности. Катепсины характеризуются гетерогенностью и отличаются спецификой гидролиза пептидных связей. Свойства катепсинов достаточно изучены при традиционном характере автолиза: гидролизуют концевые участки полипептидных цепей – B_1 , D, H, LiG катепсины. Внутренние пептидные связи активно расщепляют A, B_2 и C катепсины. Очевидно, в связи с этим они играют решающую роль в характере и глубине изменений мышечных белков. Различаются они строением активного центра: B_1 – тиоловая (цистеиновая) протеиназа, D – карбоксильная, H – аминокарбоксипептидаза, B_2 – неспецифическая карбоксипептидаза, активно гидролизует пептиды, C – тиоловая экзопептидаза. Предполагается, что катепсины L, B, Ni Ди играют определенную роль в деградации, где важную роль играет катепсин D – фермент с высокой активностью и субстратной специфичностью. Они осуществляют распад макромолекул, образуя легко адсорбируемые мономеры. Примером подклассов служат группы ферментов, действующие на сложные эфиры, на простые эфиры, на пептиды, на углерод-углеродные связи;

IV класс – Лиазы (синтазы) – катализируют разрыв С-О, С-С, С-N и других связей, а также обратимые негидролитические реакции отщепления различных функциональных групп. Они объединены в 7 подклассов, их действие сопровождается образованием двойной связи, а

также присоединением групп к месту двойной связи. Лиазы - сложные ферменты, в которых коферментами выступают: пиридоксальфосфат, тиаминдифосфат, участвует магний, кобальт. Подклассы выделяются в зависимости от природы атакуемой связи, например, углерод-углеродные связи, углерод-кислородные, углерод-азотные;

V класс – Изомеразы - осуществляют превращения в пределах одной молекулы. Коферментам являются: пиридоксальфосфат, дезоксиаденозилкобаламин, глутатион, фосфаты моносахаридов (глюкозо-1,6-дифосфат) и др. Подклассы разделяют в зависимости от типа реакции. Например, первый подкласс ферментов катализирует обратимое превращение L- и D-стереоизомеров (рацемазы) и превращения изомеров, имеющих более одного центра асимметрии, например, α -D-глюкозу в β -D-глюкозу (эпимеразы);

VI класс – Лиазы (синтетазы) - ферменты, катализирующие присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргических молекул). Лиазы – сложные ферменты. Они содержат нуклеотидные (УТФ), биотиновые (витамин Н), фолиевые коферменты. Выделяют 6 подклассов. Примером подклассов служат группы ферментов по виду образуемой связи: углерод-кислород (C–O), углерод-сера (C–S), углерод-азот (C–N), углерод-углерод (C–C);

Ферменты делят по растворимости. К растворимым относят ферменты, активная часть которых растворяется в водной среде, при этом растворимый препарат остается в реакционной среде и вторично не используется.

Помимо растворимых, существует группа иммобилизованных ферментов, которые включены в изолированную фазу, отдаленную от фазы свободного раствора, но способную с ней обмениваться молекулами [20]. Иммобилизация путем связывания с носителями растворимых ферментов или клеток микроорганизмов позволяет сохранить ферментативную активность. Распространение на практике получили сорбция на носителе, ковалентное связывание и включение в структуру гелей-носителей [21].

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ перед растворимыми при проведении процессов промышленного биокатализа. Возможности применения растворимых ферментов ограничены, по крайней мере, двумя причинами. Во-первых, они неустойчивы при хранении, а также при различных воздействиях, особенно тепловых. Во-вторых, многократное использование энзимов затруднено из-за сложности их отделения от реагентов и продуктов реакции.

Принципиальные методы иммобилизации ферментов представлены в виде схемы на рисунке 1.5 [22]:

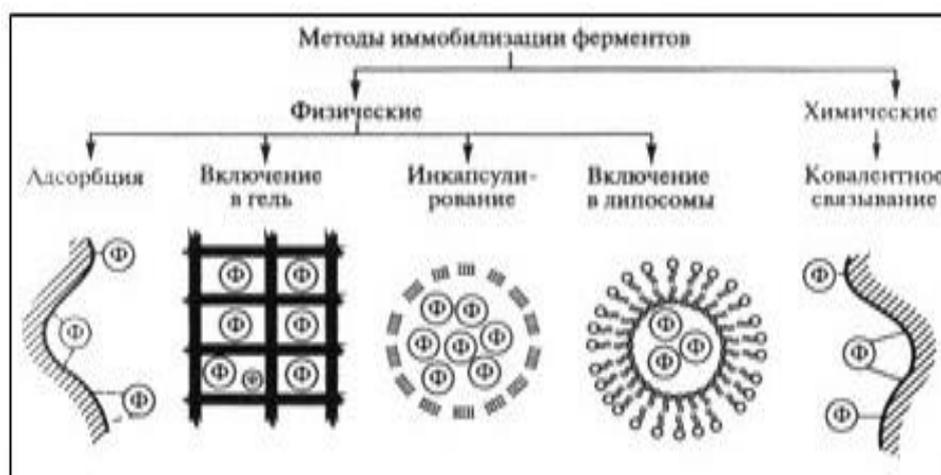


Рисунок 1.5– Методы иммобилизации ферментов

Физические методы иммобилизации ферментов реализуются посредством [22]:

1. Адсорбции ферментов на нерастворимых носителях;
2. Путём включения энзимов в поры поперечно сшитого геля;
3. Включение ферментов в полупроницаемые структуры (инкапсулирование или включение ферментов в липосомы).

При адсорбционной иммобилизации белковая молекула удерживается на поверхности носителя за счёт электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей.

Исторически первым методом иммобилизации ферментов была адсорбция, предложенная Дж. Нельсоном и Э. Гриффином (1916 г.). Она не утратила своего значения в современных условиях и широко распространена в промышленности [23]. В настоящее время описано более 70 иммобилизованных методом адсорбции ферментов на кремнеземе, активированном угле, графитовой саже, различных глинах, пористом стекле, полисахаридах, синтетических полимерах, оксидах алюминия, титане и других металлах [24].

Активность фермента при таких условиях иммобилизации сохраняется практически на 100%, а удельная концентрация белка достигает 64 мг на 1 г носителя. К недостаткам адсорбционного метода следует отнести невысокую прочность связывания фермента с носителем, что может привести к десорбции фермента, его потере и загрязнению продуктов ферментативной реакции. Повысить устойчивость системы может предварительная модификация при обработке ионами металлов, полимерами, белками, гидрофобными соединениями, монослоем липида [25]. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но и отдельных клеток.

Метод широко распространен благодаря простоте и уникальности, он обеспечивает равномерное распределение энзима в объеме носителя, дает стабильные результаты за счет высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкости и обеспечивает многократное использование включенного в его структуру фермента [24].

Используется иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры (полупроницаемые мембраны) путем микрокапсулирования или включения ферментов в липосомы. К недостаткам метода следует отнести невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов [25].

Иммобилизация путем включения водных растворов ферментов в липосомы, т. е. двойные липидные (жировые) шарики, по сути близка к

инкапсулированию. Имобилизованные таким образом ферменты используют преимущественно в медицинских и биотехнологических целях[25].

Иммобилизация ферментов с образованием новых ковалентных связей между ферментом и носителем – наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов, так как обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем, что дает высокую стабильность структуры молекулы энзима[20], однако требует применения «вставок» между ферментом и носителем в виде полифункциональных агентов (бромциан, гидразин, глутаровый диальдегид)

Для очистки ферментов применяют осаждение из водных растворов органическими растворителями, такими как метиловый, этиловый и изопропиловый спирты, ацетон; высаливание сульфатами аммония, натрия, цинка, хлорида натрия; фракционирование. Предварительно очищенные и сконцентрированные препараты высушивают в распылительных или сублимационных сушилках [26, 27].

На финальной стадии выделения и очистки ферментных препаратов, как правило, происходит их идентификация и тестирование функциональной активности. На сегодняшний день существует целый набор инструментов для их идентификации, начиная от теста на субстратную специфичность, заканчивая применением специфических антител и масс-спектропии. Масс-спектрометрия – метод исследования вещества, основанный на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации, представляющих интерес компонентов пробы. Один из мощнейших способов качественной идентификации веществ, допускающий также и количественное определение. Можно сказать, что масс-спектрометрия — это «взвешивание» молекул, находящихся в пробе [28].

На сегодняшний день также существует проблема безопасности применения ферментных препаратов. Это связано с тем, что многие из них обладают генотоксическим действием, а также могут быть ингибиторами других клеточных ферментных систем [29]. Требования к глубоким

исследованиям физико-химических, биохимических, биологических свойств, и особенно безопасности ферментных препаратов затрудняет их внедрение в широкомасштабных производствах. При этом, ферментные препараты животного происхождения, не смотря на более высокую стоимость, более предпочтительны, так как физиологичны человеку и обеспечивают полную безопасность их применения в практической деятельности человека. Вместе с тем, отечественные ученые активно ведут исследования в области получения и применения ферментных препаратов для получения пищевых продуктов, сред и ингредиентов. Имеется достаточно убедительный научный опыт, свидетельствующий о реальной перспективе внедрения ферментных технологий в производство пищевых продуктов [20, 21, 26].

1.3. Ферментные препараты в практической деятельности человека

Применение ферментов нельзя назвать достижением современности. С давних пор в таких процессах как пивоварение, изготовление хлеба, виноделие, производство сыра, использовалась биокаталитическая деятельность ферментов. В результате эмпирических совершенствований, эти традиционные технологии получили широкое распространение задолго до того момента, когда сформировались научные знания о механизмах этих процессов. Хотя история пищевых технологий насчитывает тысячелетний опыт, тем не менее, совершенствование их постоянно продолжается. В последнее время особенно наметились перспективны принципиального сдвига в технологии получения и улучшения качества пищевых продуктов. Ферменты находят применение в пищевой, текстильной, кожевенной, целлюлозно-бумажной, медицинской и химической промышленности.

По прогнозам ученых, основным потребителем ферментов в ближайшее время станет пищевая промышленность. Новые технологии позволяют расширить сферу применения ферментных препаратов. На сегодня можно

насчитать 15 отраслей пищевой промышленности, где с успехом используют ферменты, причем в каждой отрасли отдельная группа ферментов обеспечивает достижения конкретных целей, позволяющих улучшить качество продукта, увеличить его выход или удешевить процесс, а значит снизить себестоимость продукции [30, 31].

В технологии пищевых продуктов применяют ферментные препараты с амилолитической, протеолитической, липолитической, пектолитической и оксидазной активностью. Их традиционно используют в производстве спирта, пивоварении и виноделии, изготовлении фруктовых и овощных соков, в хлебопекарном производстве, сыроделии, производстве мясных и рыбных изделий, крахмалопродуктов, гидролизатов и другой продукции. Создание инновационных технологий позволило значительно расширить эту сферу применения ферментных препаратов и выявить их новые функциональные свойства и преимущества: сегодня ферменты помогают улучшить качество продукции, повысить ее безопасность, снизить себестоимость, увеличить эффективность технологических процессов, экономить ресурсы, а также способствуют сохранению окружающей среды.

В настоящее время одной из передовых технологий масложировой промышленности является энзимная переэтерификация, основанная на применении ферментных препаратов. В крахмалопаточной промышленности, благодаря применению ферментов, можно получить крахмалопродукты с заданными свойствами. С помощью энзимных технологий получают и некоторые пищевые ингредиенты, например, растительные экстракты, полисахариды, пектин и др. [32, 33].

В хлебопекарной промышленности применение ферментов способствует экономному расходованию сырьевых ресурсов, внедрению современных технологий, например, основанных на замораживании полуфабрикатов, улучшению качества готовых изделий, замедлению очерствения хлеба [34, 35]. Еще одно инновационное направление – применение специальных ферментов для предотвращения и сокращения содержания акриламида – потенциально

канцерогенного вещества, образующегося при высокотемпературной тепловой обработке изделий. Применение специально подобранного ферментного препарата при приготовлении снеков, картофеля фри, крекера, печенья и т.п. приводит к существенному сокращению акриламида и повышению безопасности готовых изделий, что особенно важно, поскольку эта группа изделий пользуется большой популярностью у детей [35].

Применение ферментных препаратов вместо солода для регулирования биокаталитических процессов, протекающих при приготовлении теста и выпечке хлеба, получило распространение и популярность. Они используются для приготовления питательных сред (заквасок) для жидких дрожжей, для активации прессованных дрожжей, а также при выпечке специальных сортов хлеба, например сорта «Рижский». Положительный опыт накоплен при внедрении в хлебопекарную промышленность ферментного препарата амилоризин *П10Х* [36].

Применение ферментных препаратов в кондитерском производстве обусловлено, с одной стороны, видом и свойством сырья, с другой стороны – технологической необходимостью и целесообразностью. Ферментные комплексы препаратов, содержащие активные протеазы и амилазы (например, амилоризин *П10Х*), ускоряют процессы брожения, корректируют физические свойства клейковины муки, изменяют реологические свойства теста и ускоряют его «созревание».

В кондитерской промышленности для производства отливных помадных корпусов конфет, круглых помадных корпусов и жидких фруктовых начинок, таких как вишневый ликер, применяют препарат инвертазы. Однако с 2010 года эта добавка была исключена из списка разрешенных пищевых добавок. Также, запрещенной она является в Австралии и в Новой Зеландии. В странах же Евросоюза инвертаза, напротив, разрешена. В США про добавку E1103 вообще нет каких бы то ни было упоминаний [37].

Производство кисломолочных продуктов основано на химическом превращении лактозы в молочную кислоту. Кефир производят подобным

образом, но производственной особенностью является то, что берут не только кисломолочные бактерии, но и дрожжи. В результате переработки лактозы образуется не только молочная кислота, но еще и этиловый спирт. При получении кефира происходит еще одна реакция – это гидролиз белков, что способствует его лучшему усвоению организмом человека [38].

В пищевой промышленности пепсин используют (в комплексе с химозином в виде сычужного фермента) для свертывания казеина молока при производстве творога и сыра, что является традиционной технологией уже на протяжении многих десятков лет. Помимо традиционных технологий сыра, также внедряются инновационные ферментные технологии, например, для производства низколактозных продуктов, что дает технологические преимущества и позволяет повысить пищевую ценность этих продуктов для людей.

Внесение специфических протеолитических ферментов существенно ускоряет процессы и изменяет свойства мяса [39-43]. Несмотря на сравнительную новизну ферментативного способа обработки мяса, он нашел широкое применение в мясоперерабатывающей промышленности ряда стран. На сегодняшний день его использование является обычной практикой для США, Канады, Англии, Франции, Германии и др. Ферменты протеолитического и коллагеназного действия, в мясе и мясных системах позволяют [40]:

- интенсифицировать автолитические процессы и ускорить созревание;
- обеспечить высокий уровень сочности и нежности мяса;
- увеличить объем производства высококачественных натуральных мясных изделий;
- получить новые источники мясных ресурсов в виде мясных паст, эмульсий, гидролизатов для обогащения разнообразных пищевых продуктов белком, разработки лечебного питания;
- использовать в составе рецептурно-компонентных решений мясопродуктов взамен основного сырья;

- рационально и максимально использовать мясные ресурсы при увеличении выхода полезных продуктов с единицы используемого сырья.

Улучшение качества мяса путем ферментативной обработки перспективно и еще по тому, что стоимость мяса относительно высока, а количество требующихся для мягчения ферментов невысоко.

А.А. Донцом в 1998-2002 г.г. изучалась возможность применения ферментативного препарата коллагеназы из гепатопанкреаса камчатского краба в технологии производства мясных консервов, цельномышечных деликатесных мясных продуктов, белковожировой эмульсии, позволяющая увеличить объемы использования низкосортного мясного сырья, интенсифицировать технологический процесс, сократить временные и энергетические затраты, а также увеличить биологическую ценность и перевариваемость готовых продуктов, улучшить их органолептические показатели [40].

В результате работы Бибишева Р.А.[41] изучены некоторые свойства протеолитического ферментного препарата применительно к обработке мышечных и соединительнотканых белков мяса. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном действии ферментного препарата «Протепсин», на структуру мышечного волокна и на соединительные ткани, которые коррелируют с улучшением функционально-технологических характеристик биомодифицированного сырья, качеством и биологической ценностью продуктов.

В.Г. Боресков с соавторами проводили исследования по использованию ферментных препаратов для создания продуктов на основе мелкокускового низкосортного сырья близких по свойствам к изделиям бескостного кускового мяса. Предложенная технология предусматривала обработку говядины второго сорта ферментным препаратом протеолитического действия и гидроколлоидами белковой и полисахарной природы. Полученный продукт по своим свойствам был близок к солено-вареным мясным продуктам, производимым из высокосортного сырья [42, 43]. Кроме того, разработал

технологии производства формованных продуктов из низкосортной говядины, обработанной препаратом протеазы из гидробионтов. Полученные продукты превосходили традиционные аналоги, как по органолептическим, так и по качественным показателям и отличались повышенной биологической ценностью [42, 43].

Кокоевой В.С. предложена технология производства консервированных продуктов из баранины с повышенным содержанием соединительной ткани с использованием раствора ферментного препарата микробиального происхождения протолихетерм Г20х [44].

Сторублевцевым С.А. изучена целесообразность применения ферментного препарата «Нейтраз 1,5 МГ» для очистки отходов жиловки мясного сырья от не коллагеновых белковых фракций и для целенаправленной деструкции белков соединительной ткани ферментным препаратом «Коллагеназа пищевая». Разработаны технологии, позволяющие получить мясные продукты с повышенной биологической ценностью, улучшенными органолептическими показателями и высоким выходом (на 2,8% для полуфабрикатов мясных) [45-47].

Результаты исследований, проведенных Стрекаловой Е.В., показали целесообразность ферментной обработки мяса NOR, PSE и OPO говядины папаином для улучшения качественных показателей и повышению выхода цельномышечной продукции при интенсификации кулинарной обработки ферментированного сырья на 15-17%. Показано, что ферментный препарат влияет на цветообразование готовых продуктов. Ферментная обработка говядины разных качественных групп обеспечивает доступность миоглобина для нитрит-ионов. В изделиях из ферментированной NOR говядины образуется на 6,45% больше NO-пигментов, чем в неферментированных продуктах, DFD на 5,33%, а PSE на 3,06%, что обеспечивает более низкое содержание остаточного нитрита и более высокую устойчивость окраски в конечных продуктах [48].

Пономаревым В.Я. было показано, что применение ферментного препарата Мегатерин Г10х позволяет улучшить функционально-технологические характеристики низкосортного мясного сырья и применить его для выработки деликатесной продукции с хорошим качеством и достаточной биологической ценностью [49].

Шамхановым Ч.Ю. изучены условия биотрансформации кератина пера сухопутной птицы в усвояемые формы белка для производства пористых продуктов питания и кормов, а так же косметических средств и свободных аминокислот с использованием ферментных препаратов протеолитического действия [50].

Осмниним О.И. изучены свойства ферментных препаратов протеолитического действия при гидролизе побочных продуктов и отходов переработки животных и птиц последующим использованием гидролизатов в технологии пищевых и кормовых продуктов [51, 52].

Косенко И.С. было показано применение протеазы животного происхождения для обезволашивания шкурок кролика и в производстве колбасных изделий [53].

Ферменты издавна широко применяются в производстве алкагольных напитков дрожжевого происхождения [54, 55]. Разнообразные комбинации ферментных препаратов дают возможность получить различные сорта пива, а также применяются для растворения осадков в спиртных напитках. Например, чтобы в пиве не появлялся осадок белков в него добавляют протеазы (папаин, пепсин) протеолитического действия. Инновационные ферментные технологии в спиртовой промышленности создают условия для широкого внедрения ресурсосберегающих технологий путем сокращения расхода газа, воды и электроэнергии [56].

Обработка ферментными препаратами плодово-ягодной мезги и соков обеспечивает гидролиз пектиновых веществ, что значительно улучшает качество продуктов за счет дополнительного гидролиза гемицеллюлозы и других компонентов сырья. При этом важен подбор ферментных препаратов,

создание композиций с заданным составом и уровнем активности отдельных ферментов. Важно также учитывать особенности химического состава и условий технологической обработки сырья, требования к конечному продукту [57, 58].

Основное свойство ферментов, применяющихся в сельском хозяйстве, состоит в том, что ферменты улучшают питательность кормов [59-61]. В мировом животноводстве ферменты нашли широкое применение, начиная с 1970 года. Использование кормовых ферментов в животноводстве обусловлено прежде всего их способностью эффективно расщеплять трудноусвояемые животными вещества, такие как некрахмалистые полисахариды (арабиноксиланы, 3- глюканы, целлюлоза, олигосахариды) и фитаты. В кормлении животных в основном находят применение ферменты, относящиеся к классу гидролаз: амилолитические, протеолитические, пектолитические, цитолитические и целлюлозолитические. В настоящее время на рынке широко представлены мультиэнзимные комплексы, сочетающие в себе несколько ферментов (чаще всего 5-7), подобранных в определенных соотношениях и имеющих широкий диапазон ферментативных активностей определенного действия. Их отличает большая эффективность по сравнению с моно препаратами. Например, мультиэнзимный комплекс Санзайм и фитаза Санфайз - усилители питательной ценности кормов. Ронозим VP - это мультиэнзимный препарат, который участвует в расщеплении НПС в источниках белка растительного сырья. Используют этот кормовой фермент в рационах, где присутствует повышенный ввод (до 30%) жмыха и шрота подсолнечника, рапса каноловых сортов и гороха (до 15%). Эти кормовые ферменты можно использовать в кормах, основой которых является кукуруза, с Ронозимом WX или G2G в ячменных, пшеничных или ячменно-пшеничных рационах для свиней и птицы.

«Роксазим G2G» - это термостабильные (до +85⁰С), универсальные, мультиэнзимные кормовые ферменты, применяемые в смешанных рационах, основой которых является рожь, пшеница, повышенный до 60% ввод ячменя,

до 30% овса и добавлены растительные белковые компоненты. Основными потребителями кормовых ферментов являются птицеводческие и свиноводческие хозяйства[61].

Сотрудниками ПО «Сиббиофарм»[62-64]показано, что введение в состав комбикормов ферментных препаратов существенно повышает энергетическую ценность кормов, улучшает всасывание питательных веществ в кишечнике. Ферменты позволяют использовать более дешевое фуражное зерно и недорогие источники протеинов (подсолнечниковый шрот, жмых), способствуя тем самым заметному снижению стоимости кормов, получению максимальной продуктивности животных, реализации их генетического потенциала.

Применение ферментов в медицине связано с их способностью заживлять раны, растворять образующиеся тромбы. Иногда ферменты умышленно вводят в организм для их активизации, а иногда из-за излишней активности ферментов, могут вводить вещества, которые действуют как ингибиторы (вещества, замедляющие протекание химических реакций) [66].

Пищеварительные ферменты широко используются при различной гастроэнтерологической патологии: заболеваниях желудка, тонкой и толстой кишки, желчевыводящих путей и поджелудочной железы. Показаниями для назначения ферментной терапии служат нарушения секреции эндогенных ферментов, расстройства всасывания пищевых веществ и нарушения моторики желудочно-кишечного тракта [66-68].

Пепсин, который вырабатывается слизистой желудка, входит в состав лекарственных ферментных препаратов.

Так же, ферменты в медицинской практике находят применение в качестве диагностических (энзимодиагностика) средств. В этом случае ферменты играют роль веществ, вступающих в химическое взаимодействие или способствующие химическим превращениям в физиологических жидкостях организма. В результате получают определённые продукты химических реакций, по которым в лабораториях распознают наличие того или иного возбудителя заболевания. С помощью ферментных препаратов проводят анализ содержания

глюкозы, мочевины, молочной кислоты, аминокислот, этанола, ацетальдегида, АТФ, АДФ, полиненасыщенных жирных кислот пенициллина, креатинфосфата. Кроме того, существуют ферменты, которые способны определять наличие алкоголя в крови.

Широкое применение в косметологии получили гидролитические ферменты, или гидролазы. Гидролазы входят в состав энзимных пилингов, помимо трипсина, химотрипсина, папаина (протеазы), кислот, ретинола [66, 69, 70]. Ферменты можно встретить во множестве косметических средств, например, в сыворотках, кремах, масках для лица, скрабах и пилингах [71, 72].

Протеазы растительного происхождения, выдерживающие нагревание до 90°C без заметной потери активности, являются компонентами стиральных порошков и моющих средств. В стиральные порошки вводят также α -амилазу, глюкозооксидазу и литюк-сигеназу, а уратоксидаза в составе моющих средств способствует удалению винных и жирных пятен с одежды. Глюкозооксидазу, каталазу и некоторые другие ферменты добавляют в зубную пасту — они обеспечивают их антимикробные свойства и предохранение зубов от кариеса.

В кожевенном и меховом производстве для ускорения снятия волоса со шкур и размягчения кожевенного сырья применяют препараты протеиназ (протелин и протофрадин), являющихся внеклеточными протеиназами стрептомицетов. При этом время на осуществление необходимых процессов сокращается в несколько раз, сортность и качество шерсти и кож повышается, а условия труда в этой отрасли производства резко улучшаются. В текстильной промышленности процесс расшлихтовки тканей ферментными препаратами грибного и бактериального происхождения ускоряется в 7-10 раз; эти же препараты служат для удаления серицина при размотке коконов тутового шелкопряда в производстве натурального шелка.

В настоящее время многие отрасли промышленности основаны на использовании различных ферментативных процессов. В связи с этим возникла и продолжает развиваться новая отрасль промышленности - производство ферментных препаратов.

В настоящее время в стране и мире имеют место проблемы, связанные с ограниченностью ресурсов животного белка. Поэтому увеличение производства белоксодержащих продуктов питания является важнейшей среди медикосоциальных проблем [73-76].

В условиях дефицита животноводческого сырья, состояние промышленности требует внедрения новых технологий, способствующих сокращению его потерь на всех стадиях технологического процесса. Вторичное сырье мясной промышленности, особенно коллагенсодержащее, представляет собой один из перспективных видов животного сырья. Проблема повышения эффективности использования подобных сырьевых ресурсов актуальна и тревожит специалистов отрасли.

В последнее время возрос объем мясных ресурсов с высоким содержанием коллагена, что обуславливает соответственный рост объемов низкосортного сырья с характерными низкими функционально-технологическими свойствами и ограниченностью применения, что вызывает необходимость разработки условий использования протеолитических ферментных препаратов [73, 77, 78].

На примере США, Канады, Франции, России и других стран показано, что ферментная обработка мяса весьма полезна для мягчения и повышения сортности, что позволяет увеличить объем выработки натуральных мясных полуфабрикатов, улучшить качество соленых мясных изделий, рационально и максимально использовать маловостребованные ресурсы для вовлечения в основное производство, а также для обогащения пищевых систем и получения новых источников и форм пищи [77].

Применение протеолитических ферментов для мягчения мяса известно давно, еще до прибытия белых переселенцев на Американский континент, когда заворачивали куски мяса в листья папайи в Центральной и Южной Америке. Опыт промышленного применения ферментов для этой цели появился сравнительно недавно, теоретические исследования в этом направлении начались примерно с начала 40-х годов XX века [78-80].

В 60-х годах в США были разработаны способы применения ферментных препаратов для достижения нежности мяса. Авторы предложили мясную тушу после уоя и разделки подвергать шприцеванию водным раствором ферментов с коллагенолитическим эффектом из *Cl. histolyticum* и эластазой из свиной поджелудочной железы [81-83].

Получить гидролизаты из малоценных продуктов переработки тушек птицы предложено в Германии, когда в измельчённое сырьё вносят препараты из *B. subtilis*, *A. oryzae*, *P. latex*, *A. melleus*, а гидролизаты подвергают сушке в условиях с минимальными потерями лизина, а затем используют для приготовления супов [84]. Известны способы получения пищевых гидролизатов путем автолиза под действием тканевых ферментов сырья.

Рекомендовано также получать пищевые гидролизаты из костного остатка после механической обвалки тушек птицы. Согласно этому способу, для получения гидролизатов используют микробные протеолитические препараты из *B. subtilis*, *P. latex*, *A. melleu.* и др.

В Англии отмечено положительное действие ферментного препарата из *Penicilliumroqueforti* на реологические свойства говядины при посоле. При этом отмечено снижение усилия среза, улучшение пластичности и нежности мяса. Дополнительно значительно улучшались органолептические показатели готового продукта.

Во Франции предложен способ ферментативной обработки мясного сырья при увеличении доли водорастворимых белков, пептидов и аминокислот для улучшения эмульгирующих свойств и питательной ценности.

В традициях народов Севера или жителей некоторых прибрежных стран, таких как Япония, использование сырого мяса или рыбы – богатых источников витаминов и других биологически активных веществ, ферментов, которые активно включаются в переваривание животного белка, усиливая действие ферментов желудка и поджелудочной железы, улучшая перевариваемость, а следовательно повышая биологическую ценность [82].

При исследовании влияния обработки актинидина на консистенцию

мясаяпонскими учеными установлено, что ферментгидролизу подвергаются мышечные (актин, миозин) и соединительнотканые белки. При этом, характер воздействия фермента синергичен химотрипсину.

Аналогичные исследования провел Muller на примере препаратов растительного происхождения (папаин, бромелаин, фицин) в технологии солено-вареных мясных изделий, показана необходимость проведения специальных исследований, способов внесения ферментных препаратов и их смесей в сырье, динамики инактивации ферментов при тепловой обработке.

В Болгарии показана целесообразность использования препарата мезентерин в составе рассола. Отмечалось значительное улучшение влагосвязывающей и влагоудерживающей способности говяжьего сердца за счет увеличения количества гидрофильных центров, образующихся в результате распада сложных белковых агрегатов исходного сырья.

Показано [85], что повышение качественных характеристик быстрозамороженных полуфабрикатов мясных рубленых может быть достигнуто модификацией мясного сырья коллагенолитической протеиназой, вырабатываемой в ЗАО «Биопрогресс» из гепатопанкреаса краба, и использованием растительных наполнителей, повышающих стабильность липидной фракции мясных продуктов.

Во ВНИИМПе совместно с Институтом молекулярной генетики РАН, Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина [86] создан биологически активный ферментный препарат из *Serratia proteamaculans-94*. С температурным оптимумом действия на мясное сырье в пределах 4-10°C и pH=5,8-6,0. Условия тепловой обработки мясных продуктов обеспечивают полную инактивацию фермента. Внесение 0,15% ферментного препарата повышает перевариваемость белков *in vitro* на 20,6% по сравнению с контрольным образцом.

Оригинальный ферментный препарат пилорин обладает протеолитической, гиалуронидазной и амилазной активностями. При обработке белков мяса отмечен хороший размягчающий эффект, ускорение процесса

созревания в посоле, повышение выхода и улучшение качества готовых изделий. Выведенная зависимость протеолитической, гиалуронидазной и амилазной активностей от рН среды, температуры и концентрации хлорида натрия обеспечивает целесообразность применения пилорина для тендеризации мясопродуктов, содержащих значительное количество соединительной ткани [86].

Использование фермента лидальбина при производстве соленых продуктов из баранины оказалось также полезным. Струйное инъектирование в сочетании с массажем приводит к усилению действия тканевых ферментов и обеспечивает равномерное распределение структур в ткани, вызывает более интенсивное накопление свободных аминокислот - предшественников веществ, ответственных за формирование вкусоароматических свойств продукта. Разработанный способ позволил усовершенствовать технологию производства формованной конины [87, 88].

Сотрудниками ВГУИТ под руководством проф. Антиповой Л.В. предложен ряд перспективных способов обработки мясного сырья с большим содержанием соединительной ткани ферментными препаратами микробного и животного происхождения для улучшения биологической ценности, повышения функционально-технологических свойств сырья и качества готовых изделий, расширения ассортимента мясных продуктов. Специалистами МГАПБ и Института генетики и цитологии СО РАН разработан и апробирован в лабораторных условиях иммобилизованный ферментный препарат - иммозим для использования в технологии фаршевых мясных изделий [89]. Смоделирована оптимальная рецептура колбасного хлеба с преимущественным использованием низкофункционального мясного сырья, модифицированного митазой. Скорость перевариваемости ферментами желудочно-кишечного тракта белка колбасного хлеба, изготовленного из предварительно ферментированного митазой низкосортного мясного сырья под действием пепсина, возрастает на 9 % по сравнению с контролем. Анализ аминокислотного состава продукта свидетельствует о соответствии

аминокислотного скора требованиям ФАО/ВОЗ [90-92].

Проведены эксперименты по изучению влияния пепсинов на мышечную и соединительную ткани говядины. Существенные морфологические изменения, вызванные действием ферментного препарата характерны для мышечно- и соединительнотканых структурных элементов мяса. Пепсин обладает выраженной пептидазной активностью в отношении мио фибриллярных, саркоплазматических белков и коллагена. На основании результатов исследований разработаны оригинальные технологии ферментированных мясопродуктов [93-96].

Белоусов А.А. показал, что специфическое действие ферментных препаратов на мышечные и соединительнотканые белки фиксируются в виде фрагментации мышечных волокон, набухания, разволокнения и деструкции волокон соединительной ткани. Аналогичные научные результаты получены зарубежными авторами при разработке пищевых гидролизатов путем автолиза сырья содержащимися в нём ферментами, а также при получении пищевых гидролизатов из костного остатка после механической обвалки тушек птицы с использованием микробных протеолитических препаратов из *B. subtilis*, *P. latex*, *A. Melleus* [97, 98]. Для более эффективного гидролиза белков животного происхождения известно применение предварительной кислотной или щелочной обработки, а затем - ферментативного гидролиза.

Сфера применения биотехнологии в пищевой промышленности постоянно расширяется. Перспективам применения биотехнологии в мясной промышленности посвящены публикации [99-105].

За рубежом - в США, Канаде, Англии, Франции, Германии и др. странах ферментативный способ обработки мяса вошел сегодня в повседневную практику мясоперерабатывающих предприятий.

В России применение ферментных препаратов для обработки мясного сырья пока широкого распространения не имеет из-за ряда объективных и субъективных причин, прежде всего связанных с ограниченностью сертифицированных препаратов известного действия на сложный комплекс

белков мяса и заданных уровней активности и стабильности.

Следует выделить, как имеющую особое значение, ферментацию белков и белковых систем упроченной структуры. Применение ферментов с заданными свойствами приводит к значительному повышению биологической и технологической функциональности коллагенсодержащего сырья, позволяя частично заменять основное сырье, улучшать свойства и выход продуктов за счет конверсии структуры белков и трансформации свойств сложных биологических систем в получении мясопродуктов - известного источника полноценных белков в рационах.

В то же время, остается актуальным вопрос о практической реализации предложенных методов и подходов. Достаточно сказать, что в 99 % случаев для мягчения мясного сырья применяется папаин. И это несмотря на чрезвычайно широкий спектр исследованных препаратов, в том числе отечественного производства. Применительно к молочной отрасли следует подчеркнуть что сычужный фермент практически единственный препарат, проявляющий стабильные свойства в технологии белковых молочных продуктов. Однако возможность максимального использования побочных молочных продуктов на базе их ферментной обработки изучена крайне не достаточно, отсутствует научная база целенаправленного действия ферментов на белковые фракции с целью получения продуктов с заданными свойствами.

Чрезвычайно медленное внедрение энзиматической модификации обусловлено в первую очередь дефицитом доступных в промышленных масштабах, недорогих ферментных препаратов, имеющих необходимый спектр активности. Некоторые исследованные препараты продуцируются патогенными или условно патогенными микроорганизмами, либо технология их получения включает обработку токсичными веществами, что делает принципиально невозможным их (ферментных препаратов) применение в пищевой промышленности.

Кроме того, проведенные исследования, при характеристике качественных

изменений мясного и молочного сырья в процессе ферментативной обработки, зачастую не учитывают влияние технологических параметров на свойства самих ферментов, вследствие чего разработанные аспекты использования ферментных препаратов малоприменимы к промышленному производству.

С другой стороны, технологии, предоставляемые зарубежными фирмами, используют весьма дорогостоящие препараты, все преимущества применения которых перечеркиваются высокой себестоимостью полученных продуктов.

Таким образом, наиболее перспективна разработка отечественного препаратов с физико-химическими и функционально-технологическими свойствами для гарантированного эффекта реального использования.

Перспектива разработки и применения ферментных технологий очевидна. Отечественный и зарубежный опыт доказывают практически неограниченные возможности их использования в различных отраслях пищевой и перерабатывающей промышленности. Вместе с тем, Российское производство ферментных препаратов ограничено, а имеющиеся, - не отвечают передовому мировому опыту. Наряду с необходимостью увеличения объемов производства и развития отечественного производства ферментных препаратов, следует обеспечить действенную научно-техническую базу в области их применения в конкретных условиях и технологиях. Особенно это относится к отраслям, производящим и перерабатывающим сырье и продукты животного происхождения, связанные с ферментными препаратами протеолитического действия.

ГЛАВА II. УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Характеристика объектов исследования

В соответствии с целью и задачами исследования, в качестве основного объекта исследования обоснованно выбран препарат ферментный «Протепсин», производимый по ТУ 9219-005-42789257 на базе ЗАО «Завод эндокринных ферментов» (Россия, Московская область, поселок Ржавки). Препарат вырабатывается из мышечного желудка кур. Согласно информации фирмы-производителя [39, 41, 45-47] ферментный препарат включает комплекс кислых протеаз с молокосвертывающим эффектом и рекомендуется для обработки мясного сырья и продуктов его переработки. Состав протеолитического комплекса препарата содержит ферменты, воздействующие на различные белки мяса и мясных систем. Проявляет свойства аналогичные тканевым ферментам-катепсинам при воздействии на белки мяса. «Протепсин»- порошок светло-серого цвета, выпускается по уровню протеолитической активности: 50, 100 и 150 ед/г. При производстве мясопродуктов «Протепсин» применяют в количестве 0,01 ÷ 0,05% к массе продукта.

Рабочая активность препарата проявляется при 20-45°C. Оптимальная температура работы фермента в мясных системах –40-45°C. Полная инактивация протеаз ферментного комплекса происходит при 70 °С в течении 15 мин. Рекомендуемая норма внесения препарата рассчитана на состояние системы с рН 4,5÷6,0 [106].

В соответствии с целью и задачами работы объектами исследования служили:

- говядина ИиШ сортов по ГОСТ Р 54315 в охлажденном и замороженном состоянии;
- измельченное мясное сырье, мясные продукты на его основе с применением биотехнологических методов обработки и без таковой;

- шкурка свиная и субпродукты охлажденные.

Вспомогательное сырье и материалы применяли в соответствии с нормативно-технической документацией.

Образцы говядины для исследований отбирали по ГОСТ Р 51447, ГОСТ 9792 после чего составляли объединенную пробу и, обозначая наименование образца, заворачивали в пергамент. Для исследований из объединенной пробы составляли среднюю пробу в соответствии с известными рекомендациями.

В качестве контрольных образцов использовали мясное сырье и продукты, не подвергнутые ферментной обработке, или произведенные по традиционным, утвержденным в установленном порядке, технологическим инструкциям.

2.2. Методы исследований

Определение протеолитической активности

Общую протеолитическую активность (ПА) ферментных препаратов определяли модифицированным методом Ансона [103, 107] с использованием в качестве субстрата казеина по Гаммерстену (рН устанавливали с помощью фосфатного буфера).

Скорость реакции протеолиза оценивали по количеству образовавшегося тирозина, определяемого колориметрически по цветной реакции с реактивом Фолина-Чекалтео [107, 108].

За единицу ПА принимали количество фермента, которое за 1 мин при 30 °С катализирует переход в не осаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние количество субстрата, содержащее 1 мкмоль тирозина.

Протеолитическую активность рассчитывали по формуле:

$$ПА = \frac{c \cdot D \cdot 1000}{ТЭ \cdot 10 \cdot a}, \quad (2.1)$$

где:

c - отношение объемов реакционной смеси и раствора фермента после добавления трихлоруксусной кислоты;

D – оптическая плотность раствора;

$TЭ$ – тирозиновый эквивалент, определенный по калибровочному графику;

t_0 – продолжительность гидролиза, мин;

a – масса ферментного препарата, взятого для реакции, мг;

1000 – коэффициент пересчета г в мг.

Определение молокосвертывающей активности

Молокосвертывающую активность (МСА) определяли в натуральном обезжиренном молоке при рН 6,5 и температуре 35°C по методу, разработанному ВНИИМС (1978г.), который состоит в следующем: 50 мл обезжиренного молока в стакане вместимостью 100 мл нагревали до температуры 35°C. Затем вносили 1 мл раствора фермента. Предварительно готовили 1% раствор препарата в дистиллированной воде. О влиянии МСА судили по времени образования молочного сгустка.

За единицу МСА принимали количество фермента, обеспечивающее образование сгустка через 40 минут после его внесения в молоко (время, рекомендованное применительно к технологии производства сыров). Расчет активности ферментного препарата вели по формуле:

$$MSA = \frac{2400 \cdot 50}{\tau \cdot v \cdot c}, \quad \text{ед./ч} \quad (2.2.)$$

где:

50 – объем молока, взятый для анализа, мл;

τ – время образования сгустка, сек.;

v - объем исследуемого фермента, г/мл;

2400 – сравнительно время образования сгустка (40 минут);

Определение пептидазной активности

Пептидазную активность определяли по методу Мура и Стейна,

основанном на определении изменения количества аминного азота. Для этой цели использовали реактив нингидрина, содержащий 0,1М цитратного буфера с рН 5,0, 4М ацетатного буфера с рН 5,0, 4% раствор нингидрина в метилцелозольве соответственно в соотношении 1:1:2 и 16 мг SnCl_2 на каждые 10 мл приготовленной смеси.

Раствор пептидов готовили в цитрат-хлоридном буфере с рН 5,0. К 4 мл раствора добавляли аликвотное количество раствора фермента. Сразу же отбирали нулевую пробу и определяли аминный азот. Для этого 1 мл пробы смешивали с 1 мл раствора нингидрина и выдерживали 15 минут на кипящей водяной бане. Затем добавляли 5 мл смеси 60% раствора этанола и определяли оптическую плотность на ФЭК-56М в кювете толщиной 3 мм и длине волны 570 нм против дистиллированной воды. По величине (разнице) оптической плотности судили о пептидазной активности.

Определение общего белка

Массовую долю белка в продуктах определяли фотометрически и методом Кьельдаля в соответствии с рекомендациями [107, 109] и по ГОСТ 25011-81.

Фракционный состав продуктов гидролиза казеина

Определение суммарных фракций белков, пептидов, аминокислот в продуктах гидролиза проводили, пользуясь методом ступенчатого осаждения[109, 110].

Навеску продукта (20 г) помещали в стаканы вместимостью 50 см³, вносили 10 см³ раствора ТХУ с массовой долей 60 % для осаждения белковых фракций. Через 20 мин выпавшие в осадок белки отфильтровывали на бумажном фильтре, промывали 10 см³ раствора ТХУ с массовой долей 5 %. Полученный фильтрат использовали для определения суммы пептидов и аминокислот.

Оставшийся на фильтре осадок белка растворяли в растворе гидроксида натрия молярной концентрацией 0,1 моль/дм³, конечный объем 25 см³. Аликвотную часть белкового раствора (10 см³) использовали для проведения биуретовой реакции. К 10 см³ раствора добавляли 3 см³ раствора КОН с

массовой долей 17 %, 2 см³ раствора CuSO₄ с массовой долей 20 % и объем довели до 25 см³ раствором КОН с массовой долей 5 %.

После тщательного перемешивания смесь центрифугировали при 50 с⁻¹ в течение 10 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости определяли на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны $\lambda = 570 \div 580$ нм.

В фильтрат, полученный после осаждения белков, вносили 1 см³ концентрированной серной и 6 см³ раствора фосфорновольфрамовой кислот с массовой долей 25%. Выпавший через 24 ч осадок отфильтровывали на бумажном фильтре и промывали 15 см³ раствора H₂SO₄ с массовой долей 5 %. Фильтрат использовали для определения содержания свободных аминокислот.

Осадок пептидов растворяли с помощью раствора NaOH молярной концентрацией 0,1 моль/дм³, конечный объем 25 см³. К 10 см³ раствора добавляли 3 см³ раствора КОН с массовой долей 17 %. После тщательного перемешивания смесь центрифугировали при 50 с⁻¹. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряли в описанных выше условиях. Расчет массовой доли белков и пептидов (X, %) проводили по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100}{2,65 \cdot a}, \quad (2.3)$$

где:

D – оптическая плотность раствора;

a – объем исследуемой смеси, см³;

Из 50 см³ фильтрата, полученного после осаждения пептидов, отбирали пробы по 2,5 см³, довели рН в них до 6,5÷7,0 раствором NaOH молярной концентрацией 1 моль/дм³. Затем объем проб довели до 5 см³ дистиллированной водой, после чего к 1 см³ нейтрлизованного фильтрата добавляли 0,5 см³ нингидринового реактива, приготовленного на монометиловом эфире этиленгликоля с добавлением хлористого олова.

Нингидриновую реакцию проводили в пробирках на водяной бане при

температуре кипения в течение 20 мин. Объем пробы доводили до 10 см³ дистиллированной водой. Оптическую плотность измеряли в описанных выше условиях.

Массовую долю аминокислот (X, %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{27,9 \cdot D \cdot 100}{a}, \quad (2.4)$$

где:

D – оптическая плотность;

a – объем исследуемой смеси, см³.

Определение аминокислотного состава

Состав аминокислот определяли методом хроматографии на автоматическом аминокислотном анализаторе марки ААА-881 (Mikrotecna, Praha) в соответствии с инструкцией к прибору.

Массовую долю аминокислот (x, мг %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_N \cdot M \cdot 50 \cdot 10 \cdot 10^{-9}}{S_{ST} \cdot m}, \text{ мг \%} \quad (2.5)$$

где:

S_N – площадь пика соответствующей кислоты на аминограмме, см²;

S_{ST} – площадь пика стандартного раствора аминокислоты, см²;

M – молекулярная масса аминокислоты;

50 – степень разведения;

10·10⁻⁹ - концентрация аминокислоты в стандартном растворе, нмоль/дм³;

m - масса навески образца, г.

Фракционный состав растворимых белков

Фракционный состав белков определяли последовательным экстрагированием водо-, соле- и щелочерастворимых белковых фракций

соответственно, дистиллированной водой, соевым раствором Вебера и раствором гидроксида натрия с массовой долей 10 % с последующим количественным определением белка с биуретовым реактивом в соответствии с рекомендациями [107].

Фракционирование и идентификация протеолитических ферментов

а) колоночная хроматография.

Хроматографию с целью разделения фракций проводили на ДЭАЕ - целлюлозе (Reanal, Венгрия) и путем гель-фильтрации на сефадексеG-100 (Pharma, Швеция) по методу, описанному в литературе [110].

ДЭАЕ – целлюлозу готовили, предварительно обрабатывая: на 1 г смолы добавляли 50 1М NaOH и тщательно перемешивали. После оседания крупных частиц смолы надосадочную жидкость декантировали. Затем смолу многократно промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. Осадок суспендировали в пятидесятикратном объеме 1Н HCl. После оседания суспензии надосадочную жидкость сливали и осадок промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. Затем обработку смолы 1Н раствором NaOH повторяли.

Обработанную смолу переносили в колонку 1,5 × 35 см. Стартовой средой служил 0,1 М ацетатный буфер с pH 4,5, которым смолу уравнивали в течение 6-8 часов (величина pH была выбрана с учетом сохранения активности фермента).

Предварительно отдиализованный против дистиллированной воды препарат наносили на колонку в количестве 250-300 мг по белку. Элюцию проводили сначала в стартовом буфере в течении 2-3 часов, а потом в градиенте молярности NaCl от 0 до 1М при скорости элюции 30 мл/час. Подачу элюирующего раствора осуществляли с помощью перистальтического насоса (LKB, Польша), а сбор фракций осуществляли с помощью автоматического коллектора фракций (LKB, Польша).

В каждой фракции объемом 3 мл определяли количество белка, МСА и ПА. Фракции, принадлежащие к одному белковому пику, объединяли и

использовали для дальнейших исследований.

Сефадекс G-100 предварительно помещали в высокий цилиндр, заливали 200-кратным объемом дистиллированной воды и подвергали набуханию при комнатной температуре в течение 72 часов. Затем его переносили в колонку размером 1 × 30 см и наносили образец в количестве 1-2% к объему колонки. Элюцию проводили дистиллированной водой со скоростью 25 мл/час. Фракции объемом 4 мл собирали с помощью коллектора фракций и анализировали на белок, МСА и ПА.

б) Электрофорез в полиакриламидном геле.

Электрофорез белков-ферментов в полиакриламидном геле (ПААГ) обладает рядом существенных преимуществ[111-113]:

- размер пор геля может варьировать в широких пределах;
- имеется возможность применять маркеры различной молекулярной массы, и следовательно, оценивать воспроизводимость результатов постоянно;
- разделения макромолекул происходит достаточно быстро (2-4 часа);
- низкая величина адсорбции и электроосмоса;
- ПААГ не поглощает в УФ области спектра при 270 нм, что не препятствует идентификации белков в геле после их разделения;
- после разделения белки можно окрашивать непосредственно в геле и определять их количество любым доступным методом.

Электрофорез в ПААГ имеет высокую разделяющую способность и успешно применяется для разделения макромолекул.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS проводили по методу Дэвиса с использованием прибора для электрофореза “Mini-Protean3” (BioRad). В данной модификации электрофореза гелевый (концентрирующий (4%) 0,5 М Tris-HCl буфер, содержащий 0,4%-ный SDS, pH 6,8 и разделяющий (12,5%) 1,5 М Tris-HCl буфер, содержащий 0,4%-ный SDS, pH 8,8) и электродный (0,025 М Tris-HCl, 0,192 М глицин, pH 6,8) буферные растворы отличаются по составу и величине pH. Использование двух типов гелей с разной концентрацией акриламида (концентрирующего и разделяющего)

приводит к тому, что белковые образцы концентрируются на их границе.

Образцы белка готовили на четырехкратном буфере для образцов: 0,125 M Tris-HCl буфер pH 6,8 4%-ный SDS 20%-ный глицерин, 0,002%-ный бромфеноловый синий, 10% -меркаптоэтанол. После добавления буфера для образцов пробы инкубировали при 95°C в течение 3 мин. На дорожку геля наносили 1-10 мкг белка. Гели после электрофореза окрашивали 0,01 % раствором Кумасси бриллиантового синего R-250 на смеси этанол – уксусная кислота – вода в соотношении 5:1:4. Избыток красителя удаляли 7% уксусной кислотой. Фракционный состав препаратов был представлен в виде окрашенных полос.

Для идентификации фракций протеолитических ферментов в ПААГ использовали два приема:

1. После электрофореза из геля вырезали участки, соответствующие расположению каждой из полос белкового спектра, и проводили экстрагирование дистиллированной водой в течении 1,5 – 2 часов при комнатной температуре. Экстракты анализировали на МСА и ПА.
2. Гели инкубировали в смеси, содержащей 5 частей 1%-го раствора гемоглобина и 1,25 части 0,1N раствора HCl при 37°C в течение 30-60 минут. Затем гели отмывали от избытка гемоглобина путем погружения геля на несколько секунд в 0,1N раствор HCl и переносили в закрытую емкость, где инкубировали еще час при 37°C в атмосфере, насыщенной парами воды. В процессе инкубации гемоглобин гидролизовался локализованными в геле протеиназами. Затем гель многократно промывали 7,5% уксусной кислотой и окрашивали раствором амидочерного. Краситель не окрашивал отрицательно заряженные кислые протеиназы, но взаимодействовал с гемоглобином. Поэтому после удаления избытка красителя 7,5% уксусной кислотой, зоны протеиназ обнаруживали по светлым полосам на темном фоне окрашенного негидролизованного гемоглобина. Используемая методика позволяет выявить 10 мкг кислой протеиназы. Визуализацию полученных гелей проводили с использованием цифровой камеры.

Определение молекулярной массы

Применяются два подхода на основе электрофоретических исследований:

а) Определение молекулярной массы протеолитических фракций по методу, разработанным Бузуном [113]. Он основан на определении зависимости между величиной пор ПААГ и величиной R_m , которая рассчитывается отношением расстояния пройденного белком к расстоянию, пройденному красителем. Метод позволяет определить молекулярную массу белков и установить, различаются ли белки величиной заряда.

Зависимость R_m от концентрации геля является линейной функцией регрессии (прямой с отрицательным наклоном). Белки-изомеры с разными зарядами, но одинаковыми молекулярными массами дают параллельные линии. Белки имеют одинаковый заряд, но дают непараллельные линии, экстраполированные к общей точке при концентрации геля, приближенно равной нулю. Белки, различающиеся как по величине заряда, так и по размеру молекул, образуют непараллельные линии, пересекающиеся при иной точке, чем нулевая концентрация геля. Чем выше молекулярная масса белка, тем более отрицательный наклон имеет линия регрессии. Ошибка метода составляет $\pm 5\%$.

б) Молекулярную массу (M) определяли с помощью оценки электрофоретической подвижности маркеров молекулярной массы и сравнивали ее с электрофоретической подвижностью экспериментальных образцов. Электрофоретическая подвижность (R_f) жесткого комплекса белок-додецилсульфат натрия (SDS) оказывается связанной с молекулярной массой белка (M) простым соотношением:

$$R_f = A - B \times \lg M, \quad (2.6)$$

где: A и B - коэффициенты, зависящие от пористости геля, температуры и других условий эксперимента. Величину R_f удобнее представлять в относительных единицах, выражающих отношение путей миграции белка и бромфенолового синего за время электрофореза, т. е. в значениях введенной ранее величины R_f . Такая замена отразится только на значениях коэффициентов

А и В. Нет смысла определять эти коэффициенты в каждом опыте. Одновременно с фракционированием исследуемой смеси можно провести электрофорез набора белков-маркеров, молекулярные массы которых точно известны. Разумеется, вся предварительная обработка SDS и меркаптоэтанолом должна быть строго одинаковой для исследуемого препарата и маркеров. Измерив длину пути, пройденного при электрофорезе лидирующим красителем и каждым из маркеров, рассчитывают значения их R_f . Затем, зная молекулярные массы маркеров, строят экспериментальную зависимость $\lg M$ от R_f . Если пористость геля выбрана правильно, то такая зависимость будет линейной. Рассчитав R_f для интересующего белка, по графику находят для него величину $\lg M$ и рассчитывают M (рис. 2.1).

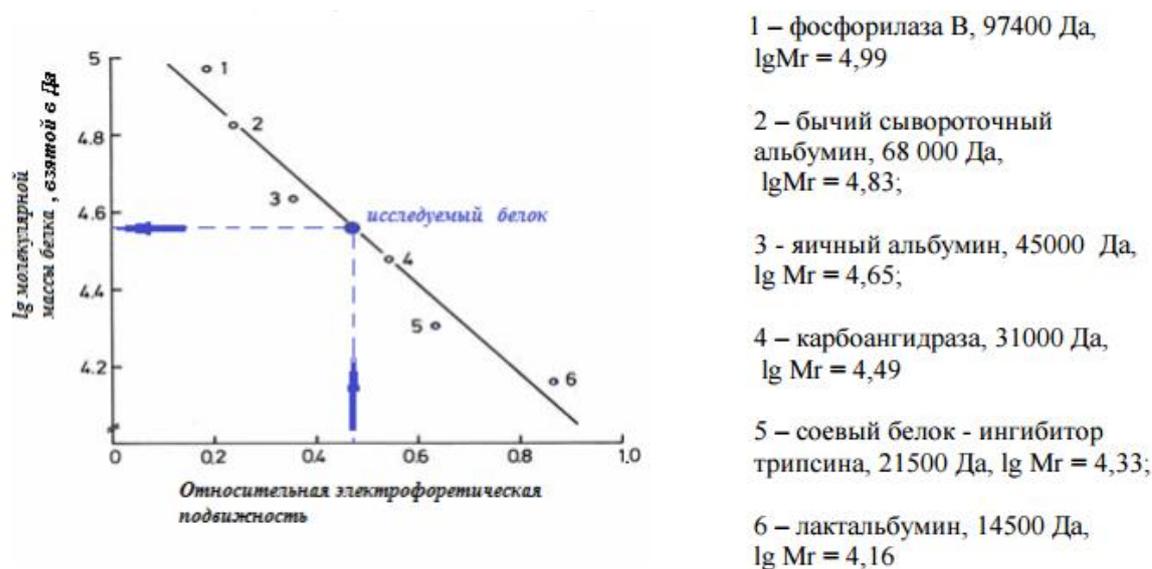


Рисунок 2.1 – Зависимость между молекулярной массой и относительной подвижностью белка при гель-электрофорезе в ПААГ в присутствии SDS (в полулогарифмической системе координат)

В настоящее время в продаже имеются наборы белков-маркеров, в которые входят очищенные нативные белки различной молекулярной массы. Кроме того, существуют наборы окрашенных соединений – маркеров

молекулярной массы, которые уже с момента нанесения на гель помогают следить за ходом электрофоретического разделения.

Определив теперь R_f для интересующего нас белка, из графика можно найти для него величину IgM и подсчитать M . Положение и наклон прямой на графике изменяются при вариации концентрации ПААГ и других условий эксперимента, поэтому нельзя пользоваться какой-либо стандартной калибровкой. График зависимости IgM от R_f строили для каждого опыта. Отметим также, что при определении R_f вводили поправки на набухание или сжатие геля при фиксации, окраске белков и удалении красителя, приводя все к исходному линейному размеру.

Метод определения молекулярной массы белков электрофорезом в ПААГ с SDS завоевал себе прочную репутацию и используется очень широко. Тем не менее, следует проявлять известную осторожность. Исследуемый белок может оказаться принадлежащим к той, по-видимому, сравнительно немногочисленной, категории белков, для которой количественное соотношение в комплексе с SDS существенно отличается от 1:1,4 [115].

Гисто-морфологические исследования.

Исследования микроструктуры мясного сырья проводили по ГОСТ Р 50372 – 92 [114]. Подготовку проб и срезов вели в соответствии с описанными в прописи рекомендациями [116].

Гисто-морфологические исследования проводили путём фиксации проб в формалине, обезвоживания в спиртах, заливки в парафин, последующей окраски срезов гематоксилин-йозином.

В процессе взятия материала, объекты подлежащие исследованию, были свежими; не допускали обмывание кусочков водой перед погружением их в фиксирующую среду; объём фиксирующей жидкости в 20-40 раз превосходил объём всех вместе взятых фиксируемых кусочков; каждый фиксируемый образец по толщине не превышал 0,5-1 см, а в некоторых случаях он был и значительно тоньше. Учитывая, что площадь кусочка при фиксации особого значения не имеет, лишь бы посуда была достаточно просторной, а горло банки

широким; при помутнении или изменении цвета фиксатора после погружения кусочков в него фиксатор меняли.

Фиксацию проводили при комнатной температуре (18-20 °С) с использованием формалина, так как он обладает высокой проникающей способностью в ткани.

Заливка в парафин производилась следующим образом. Объект из 2-го абсолютного спирта переносили на 1-3 ч в смесь равных количеств ксилола с абсолютным спиртом, затем на 1,5-2-3 ч в первый чистый ксилол и на такое же время во второй ксилол (до просветления кусочков). После ксилола объект переносили в первый чистый парафин, а через 1,5-2 ч во второй чистый парафин и оставляли его там 1-1,5 ч. Парафин был заранее приготовлен и находился в термостате, установленном на 2-3 °С выше точки плавления парафина. Так как парафиновые срезы при наклеивании вбирают воду, то во избежание артефактов при дальнейшей обработке их тщательно просушивали в термостате при температуре 37-40 °С от 2 до 24 ч.

Препараты заключали под покровное стекло, используя канадский бальзам. Изучение микроструктуры проводили с использованием светового микроскопа с увеличением объектива $\times 7$, $\times 40$ и окуляра $\times 10$. Для получения фотографий использовали фотонасадку к микроскопу.

Определение перевариваемости мясных продуктов *in vitro* [107].

В основе метода Покровского-Етранова лежит ферментативный гидролиз в условиях, при которых доступность атакуемых пептидных связей определяется не только свойствами белка, но и дополнительными факторами, связанными со структурой и химическим составом пищевого продукта.

Метод заключается в последовательном воздействии на белковые вещества исследуемого продукта системой протеиназ, состоящей из пепсина и трипсина, при непрерывном перемешивании и удалении из сферы реакции продуктов гидролиза диализом. Это позволяет избежать ингибирования пищеварительных ферментов низкомолекулярными пептидами и свободными аминокислотами.

Степень атакуемости белков в исследуемом продукте оценивали по нарастанию продуктов гидролиза в результате ферментативного переваривания. Значения концентрации тирозина, определенные по калибровочному графику, пересчитывали на общий объем жидкости наружного и внутреннего сосудов, а затем эти значения суммировали. Из концентрации тирозина, характеризующей степень гидролиза, вычитали показатели, полученные в контрольных опытах: первый опыт - раствор фермента, второй опыт - взвесь анализируемого продукта в буферном растворе. Расчеты проводили по формуле:

$$K = A - B - C, \quad (2.7)$$

где,

K – нарастание продуктов гидролиза вследствие действия протеолитического фермента, мкг/см³;

A – концентрация продуктов гидролиза в переваре, мкг/см³;

B – концентрация тех же продуктов во взвеси пищевого продукта, мкг/см³;

C – концентрация тех же продуктов в растворе фермента, мкг/см³.

Накопление продуктов гидролиза, определяемое по цветной реакции Лоури, выражали в микрограммах тирозина на 1 г сухого вещества.

Определение функционально-технологических свойств [107].

Функционально-технологические свойства мясных систем включают показатели: влагосвязывающая (ВСС) или влаговыделяющая (ВВС), влагоудерживающая (ВУС), жирудерживающая (ЖУС) способности, эмульгирующая способность (ЭС), стабильность эмульсии (СЭ).

Массовую долю связанной влаги(%) в образце вычисляли по формулам:

$$x_1 = (M - 8,4 \cdot S) 100 / m_0, \quad (2.8)$$

$$x_2 = (M - 8,4 \cdot S) 100 / M, \quad (2.9)$$

где,

x_1 – массовая доля связанной влаги в мясном объекте, % к массе мяса;
 x_2 – массовая доля связанной влаги в мясном объекте, % к общей влаге;
 M – общая масса влаги в навеске, мг;
 S – площадь влажного пятна, см²;
 m_0 – масса навески мяса, мг.

При определении влагоудерживающей способности навеску тщательно измельченного мяса массой 4-6 г равномерно наносили стеклянной палочкой на внутреннюю поверхность широкой части молочного жиромера. Его плотно закрывали пробкой и помещали узкой частью вниз на водяную баню при температуре кипения на 15 мин, после чего определяли массу выделившейся влаги по числу делений на шкале жиромера.

Расчет вели по формулам:

Влагоудерживающая способность мяса (%):

$$ВУС = В - ВВС, \quad (2.10)$$

Влаговыделяющая способность мяса (%):

$$ВВС = a \cdot n \cdot m^{-1} \cdot 100, \quad (2.11)$$

где:

$В$ – общая массовая доля влаги в навеске, %;

a – цена деления жиромера; $a = 0,01 \text{ см}^3$;

n – число делений на шкале жиромера;

m – масса навески, г.

При определении жирудерживающей способности (ЖУС) предварительно рассчитывали ВВС, находили массу навески мяса, оставшегося в жиромере, с точностью $\pm 0,0001$ г. Мясо помещали в бюкс и высушивали до постоянной массы при температуре 150 °С в течении 1,5 ч. После высушивания брали навеску массой $(2,000 \pm 0,0002)$ г, помещали в фарфоровую ступку, куда добавляли 2,5 г мелкого прокаленного песка и 6 г ($4,3 \text{ см}^3$) α -монобромнафталина. Содержимое ступки тщательно растирали в течении 4 мин и фильтровали через складчатый бумажный фильтр.

Испытуемый раствор (3-4 капли) равномерно наносили стеклянной палочкой на нижнюю призму рефрактометра. Призмы закрывали, скрепляли винтом. Луч света направляли при помощи зеркала на призму рефрактометра, устанавливая зрительную трубу так, чтобы были отчетливо видны пересекающиеся нити (алиада). Алиаду передвигали до тех пор, пока граница между освещенной и темной частями не совпадет с точкой пересечения нитей, отсчитывали показатель преломления α -монобромнафталина. Определения повторяли несколько раз, используя при расчете средние данные.

Жироудерживающую способность мяса (%) рассчитывали по формуле:

$$\text{ЖУС} = g_1 \cdot g_2^{-1} \cdot 100, \quad (2.12)$$

где:

g_1 – массовая доля жира в навеске после термообработки, %;

g_2 – массовая доля жира в навеске до термообработки, %.

Массовую долю жира в навеске (%) рассчитывали по формуле:

$$g = [10^4 \cdot \alpha(n_1 - n_2) \cdot m_1] / m, \quad (2.13)$$

где:

α – коэффициент, характеризующий такую массовую долю жира в растворителе, численное значение которой изменяет показатель преломления на 10^4 %;

n_1 и n_2 – показатели преломления соответственно чистого растворителя и испытуемого раствора;

m_1 – масса $4,3 \text{ см}^3$ α -монобромнафталина, г;

m – масса навески, г.

Коэффициент α устанавливали опытным путем при сопоставлении результатов определения массовой доли жира методом Сокслета и рефрактометрически. Расчет вели по формуле:

$$\alpha = g_{\phi} / (10^4 \cdot \Delta n), \quad (2.14)$$

$$g_{\phi} = (m \cdot 100) / m_p, \quad (2.15)$$

где:

g_{ϕ} – массовая доля жира в фильтрате, %;

Δn – разность между показателями чистого растворителя и испытуемого фильтрата;

m – масса жира в навеске, определенная в аппарате Сокслета, г;

m_p – масса навески растворителя, г.

При определении эмульгирующей способности (ЭС) и стабильности эмульсии (СЭ) навеску измельченного мяса массой 7 г суспензировали в 100 см³ воды в гомогенизаторе (или миксере) при частоте вращения 66,6 с⁻¹ в течении 60 с. Затем добавляли 100 см³ рафинированного подсолнечного масла и смесь эмульгировали в гомогенизаторе или миксере при частоте 1500 с⁻¹ в течении 5 мин. После этого эмульсию разливали в 4 калиброванные центрифужные пробирки вместимостью по 50 см³ и центрифугировали при 500 с⁻¹ в течении 10 мин. Далее определяли объем эмульгированного масла.

Эмульгирующую способность (%) рассчитывали по формуле:

$$ЭС = (V_1 / V_2) \cdot 100, \quad (2.16)$$

где:

V_1 – объем эмульгированного масла, см³;

V_2 – общий объем масла, см³.

Стабильность эмульсии определяли путем нагревания при температуре 80 °С в течении 30 мин и с последующим охлаждением водой в течении 15 мин. Затем заполняли эмульсией 4 калиброванные центрифужные пробирки вместимостью по 50 см³ и центрифугировали при частоте вращения 500 с⁻¹ в течении 5 мин и определяли объем эмульгированного слоя.

Стабильность эмульсии (%) рассчитывали по формуле:

$$СЭ = (V_1 / V_2) \cdot 100, \quad (2.17)$$

где:

V_1 – объем эмульгированного масла, см³;

V_2 – общий объем масла, см³.

Определение цветовых характеристик мяса на спектрофотометре [115].

Мясо и мясные продукты обладают, как правило, шероховатой поверхностью, которая рассеивает падающий на нее свет. Рассеянный свет имеет неодинаковую интенсивность на разных длинах волн, т.е. характеризуется определенным спектром – зависимостью интенсивности от длины волны. Согласно трехцветной теории зрения в сетчатой оболочке глаза имеются колбочки трех видов. Одни из них реагируют на свет с длиной волны 600-750 нм (красный), другие – на зеленый ($\lambda=400-450$ нм). Например, если спектр отражения предмета характеризуется максимумом при 620 нм, то это излучение раздражает колбочки первого вида, и мы воспринимаем предмет как красный. Для количественной оценки цветовых ощущений, создаваемых излучением, используют две величины: световой поток, падающий на глаз человека и цветность.

Цветность – это двухмерная величина, определяемая соотношением уровней возбуждения трех цветовых аппаратов среднего человеческого глаза, работающего в условиях дневного освещения. Если один из уровней принять за единицу, два других будут нести информацию о цветности (на практике за единицу принимают сумму уровней). Так как цветность – двухмерная величина, она может быть отображена в виде точки на плоскости и охарактеризована двумя координатами x и y . Точки, характеризующие цветности монохроматических излучений с различной длиной волн, составляют на такой плоскости кривую ABC точки, соответствующие цветам различных предметов, попадают внутрь треугольника, образованного кривой ABC и нижней пунктирной линией (это так называемый цветовой треугольник).

По спектру отражения какого-либо тела можно определить координаты его цветности x и y . Для этого:

- 1) Разбивали спектр на n участков ($n=30$)

2) Для каждой длины волны λ_i находили по спектру коэффициент отражения R_{λ_i}

3) Определяли интегральные цветовые координаты:

$$x' = \sum_i E_{\lambda_i} \bar{x}_{\lambda_i} R_{\lambda_i} \quad y' = \sum_i E_{\lambda_i} \bar{y}_{\lambda_i} R_{\lambda_i} \quad z' = \sum_i E_{\lambda_i} \bar{z}_{\lambda_i} R_{\lambda_i}, \quad (2.18)$$

$$E_{\lambda_i} = \frac{E_i}{\Delta\lambda_i} \quad (2.19)$$

где:

E_i – энергия, излученная образцовым источником света в интервале длин волн;

$\Delta\lambda_i$; \bar{x}_{λ_i} , \bar{y}_{λ_i} , \bar{z}_{λ_i} , – коэффициенты, учитывающие способность человеческого глаза воспринимать свет с длиной волны λ_i . Значение произведений $E_{\lambda_i} \bar{x}_{\lambda_i}$, $E_{\lambda_i} \bar{y}_{\lambda_i}$, $E_{\lambda_i} \bar{z}_{\lambda_i}$ для образцового источника приведены в специальных таблицах. За образцовый источник брали обычно цвет солнца при сильно пасмурной погоде.

По значениям x' , y' , z' рассчитывали координаты цветности:

$$x = \frac{x'}{x' + y' + z'}, \quad y = \frac{y'}{x' + y' + z'} \quad (2.20)$$

Величина $L_{\text{откл}}$, характеризующая степень отличия изучаемых образцов от эталонного в системе XY, получена как расстояние между точками по формуле:

$$L_{\text{откл}} = \sqrt{(x_{\text{эт}} - x_{\text{тек}})^2 + (y_{\text{эт}} - y_{\text{тек}})^2}, \quad (2.21)$$

где:

$x_{\text{эт}}$, $y_{\text{эт}}$ – координаты цветности эталонного образца,

$x_{\text{тек}}$, $y_{\text{тек}}$ – координаты цветности изучаемых образцов.

В современных приборах измерения цвета – колориметрах и

спектрофотометрах, оперировали величинами L^* , a^* , b^* , являющимися производными от координат системы XYZ:

$$\begin{aligned}L^* &= 116(y^*/y^0)^{1/3} - 16 \\ a^* &= 500[(x^*/x^0)^{1/3} - (y^*/y^0)^{1/3}] \\ b^* &= 200[(y^*/y^0)^{1/3} - (z^*/z^0)^{1/3}]\end{aligned}\quad (2.22)$$

где:

x^0 , y^0 , z^0 – координаты цвета стандартного источника света, встроенного в прибор.

Поскольку в системе XYZ координата y' пропорциональна светлоте цвета, величина L^* , определяемая формулой, также является характеристикой светлоты, но в отличие от y' – с учетом специфики восприятия цвета человеческим глазом. В пространственной системе координат $L^*a^*b^*$ по вертикальной оси отложены значения L^* , а по двум горизонтальным – a^* и b^* . Все существующие в природе цвета на такой трехмерной диаграмме представлены точками, совокупность которых образует тело цветового охвата, представляющее собой весьма деформированный пространственный многогранник.

Цветовое различие любой пары цветов, отличающихся в общем случае всеми тремя характеристиками (L^* , a^* и b^*), определяется величиной ΔE по следующей формуле:

$$\Delta E = \sqrt{[(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2]}\quad (2.23)$$

Величина ΔE соответствует отрезку прямой между двумя точками сравниваемых цветов в пространственной системе координат.

Общие методы экспериментальных исследований [107].

Массовую долю гигроскопической влаги определяли в сырье и продуктах путем высушивания образцов при температуре 100-105°C в течении 3 часов,

жира рефрактометрическим методом и методом Сокслета, суммарных минеральных веществ путем сжигания органических веществ в муфельной печи при температуре 500-700°C в течение 5-6 часов до постоянной массы в соответствии с прописью метода.

Величину рН определяли потенциометрическим методом на универсальном ионметре рН-150М согласно инструкции к прибору.

Определение качественных показателей продуктов.

Определение качества готовых изделий проводили в соответствии с ГОСТ 7269-79 [116], ГОСТ 9792-73 [117], ГОСТ 9959.91 [118, а также рекомендациями [119-121].

Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований [122].

Все экспериментальные исследования проведены не менее чем в трех повторностях, аналитические определения для каждой пробы – в двух-трех повторностях. В таблицах и на рисунках приведены данные типичных опытов, каждое значение является средним как минимум из трех определений.

Среднее арифметическое результатов экспериментов вычисляли по формуле:

$$y = \frac{\sum_{k=1}^n y_k}{n}, \quad (2.24)$$

где:

y_k – результат отдельного опыта;

n – число повторностей эксперимента.

Отклонение единичного результата от среднего арифметического:

$$\Delta y_k = y_k - y, \quad (2.25)$$

Квадратичная дисперсия:

$$S^2(y_k) = \sum_{k=1}^n (y_k - y)^2 \times (n-1), \quad (2.26)$$

Стандартное отклонение единичного результата:

$$S(y_k) = \sqrt{\sum_{k=1}^n (y_k - y)^2 \times (n-1)}, \quad (2.27)$$

Стандартное отклонение среднего результата:

$$S(y) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (y_k - y)^2}{n \cdot (n-1)}}, \quad (2.28)$$

Степень адекватности:

$$E_\alpha = t_\alpha \cdot S(y), \quad (2.29)$$

где:

t_α – критерий.

Величина доверительного интервала:

$$\Delta = y \pm E_\alpha, \quad (2.30)$$

Для математической обработки результатов исследований использованы методы регрессионного анализа с применением градиентного метода и метода наименьших квадратов, линейного программирования. Графические зависимости на рисунках представлены после обработки экспериментальных данных по методу наименьших квадратов реализованные в *MicrosoftExcel*.

2.3. Схема и условия проведения экспериментальных исследований

Экспериментальные исследования проводили с использованием ферментного препарата «Протепсин» в качестве основного объекта с уровнем активности 100 ед./г. Постановка опытов осуществлялась на базе научно-исследовательских лабораторий и Центра коллективного пользования Воронежского государственного университета инженерных технологий (г. Воронеж), Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института фармакологии, патологии и терапии (г. Воронеж), лабораторий и опытного производства фирмы «Крист» (г. Москва), а также производственных лабораторий промышленных предприятий.

Общая схема экспериментальных исследований представлена на рисунке 2.2.

Целевые показатели, позволяющие количественно оценить перспективность применения ферментного препарата «Протепсин» в технологии мясных и молочных продуктов, объединены в следующие группы:

1. Ферментный препарат «Протепсин»:

- химический и аминокислотный состав;
- протеолитическая и молокосвертывающая активность;
- фракционный состав белков-ферментов, идентификация ферментов протеолитического комплекса;
- кинетика инактивации под действием pH и температуры;
- определение молекулярных масс и аминокислотного состава протеолитических фракций ферментов препарата «Протепсин»;
- идентификация функциональных групп активного центра, субстратная специфичность;

2. Функционально-технологические свойства мясного и молочного сырья, обработанного ферментами препарата «Протепсин»:

- функционально-технологические свойства мясного сырья;
- определения усилий резания мясного сырья;

- сравнительная оценка гистоморфологических характеристик мясного сырья без обработки ферментами и с применением ферментов;

- гидролитические свойства препарата «Протеписин» при действии на молочные белки.

3. Направления рационального использования препарата в технологии продуктов животного происхождения:

- пищевая и биологическая ценность (расчетный метод и метод *invitro*);

- определение цветовых характеристик.

4. Качественные показатели и показатели безопасности продуктов в соответствии с действующей технической документацией.

5. лабораторные и опытно-промышленные испытания, расчет экономической целесообразности.



Рисунок 2.2 – Схема экспериментальных исследований

ГЛАВА III. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА «ПРОТЕПСИН»

Материалы литературного обзора и собственных исследований [123-128] позволили выделить ферментный препарат «Протепсин» как реальную перспективу создания отечественных ферментных технологий производства инновационных продуктов животного происхождения, социальное и экономическое значение которых трудно переоценить. Ферментные технологии позволят увеличить выход полезной продукции с единицы перерабатываемого сырья, снизить себестоимость, улучшить качество, повысить пищевую и биологическую ценность, рационально и максимально использовать ресурсы для производства пищевого сырья и продуктов, создать гибкий ассортимент, ориентированный на социальные и физиологические группы населения с высокими потребительскими свойствами, в том числе обогащенных биологически активными веществами, а также новые источники и формы пищи, обеспечить продовольственную безопасность страны [129-152].

Ферментный препарат «Протепсин» удовлетворяет требованиям безопасности, физиологичен для человека, обладает достаточно высокой активностью при обработке мясного и молочного сырья, относительно дешев, может производиться в достаточном количестве с перспективой наращивания объемов. Несмотря на имеющуюся информацию о ферментном препарате «Протепсин», для обеспечения на него устойчивого спроса требуются углубленные исследования физико-химических и биокаталитических свойств, а также структурных особенностей входящих в препарат ферментов для обоснования инновационных технологий, конкурентоспособных на мировом и отечественных рынках.

3.1.Общая характеристика ферментного препарата «Протепсин»

Общая характеристика ферментного препарата дана ЗАО «Завод эндокринных ферментов» и дополнена работами авторов (Бибишев, Антипова 2007). Она касается в основном свойств препарата в перспективе его применения для обработки мясного сырья и продуктов: порошок светло-серого цвета, маркируется в зависимости от уровня протеолитической активности – «Протепсин» - 50.....150. Рабочая активность проявляется в диапазоне температур 20-55°C, при оптимуме в мясных системах 40-45°C. Полная инактивация ферментного комплекса отмечается при 70°C в течении 15 минут, рекомендуемая норма при обработке мяса и мясных продуктов в диапазоне рН 4,5-6,0 составляет 0,01-0,05% к массе сырья с учетом уровня стандартной активности, вида и состояния сырья, а также особенностей технологии применения.

Препарат апробирован и зарекомендовал себя для ускорения процессов созревания и тендеризации мяса. Препарат – синергист внутриклеточным ферментам мышечной ткани, однако обладает более широким спектром воздействия на белки мяса.

Общий химический состав препарата представлен (масс, %): влага – 10,94; белок – 87,52; жир – 0,61; зола – 0,93. Исследован аминокислотный состав препарата в сравнении с известными аналогами (табл. 3.1).

Как видно из данных таблицы 3.1, в состав белков-ферментов входит полный перечень протеиногенных аминокислот. Несмотря на очевидно общие черты, ферменты отличаются по содержанию отдельных аминокислот, что может быть связано как со структурными особенностями, так и со степенью чистоты.

Таблица 3.1 – Аминокислотный состав ферментов кислых протеиназ

Аминокислоты	Содержание аминокислот г/100 г. белка		
	Микробный препарат	Пепсин Животных	«Протепсин»
Аланин	6,8	-	3,0
Аргинин	1,1	1,0	0,87
Аспарагиновая кислота	16,2	16,0	17,2
Цистин	-	1,6	1,3
Глутаминовая кислота	9,7	11,9	10,2
Глицин	6,8	6,4	5,9
Гистидин	1,1	0,9	0,98
Изолейцин	3,6	10,8	5,4
Лейцин	10,2	10,4	8,8
Лизин	0,5	0,9	1,14
Метионин	2,0	1,7	1,4
Фенилаланин	11,4	6,4	7,14
Пролин	1,7	5,0	1,13
Серин	5,0	12,2	9,9
Треонин	10,9	9,6	8,9
Тирозин	6,6	8,5	5,4
Валин	14,2	7,1	5,8
Триптофан	1,3	2,4	1,3

Заметно, что приведенные в таблице ферменты на 50 и более процентов состоят из гидрофобных аминокислот, что предполагает значительную роль гидрофобных взаимодействий в стабилизации пространственной структуры. При этом в составе преобладают аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты, сумма которых составляет 25,9-27,7%, что объясняет их «кислую» природу. В препарате «Протепсин» содержится незначительное количество гистидина, но более выражен лизин. Исходя из выше изложенного, ферменты, по всей видимости, наряду со структурными, имеют и функциональные особенности.

Данные обстоятельства диктуют необходимость углубленного изучения компонентного состава протеолитического комплекса, физико-химических свойств и структурных особенностей входящих в него ферментов. Исследования представляют интерес еще и потому, что «Протепсин»

обнаруживает молокосвертывающую активность наряду с общей протеолитической. Это важно в оценке перспектив применения препарата в обработке не только мясного, но и молочного сырья.

3.2. Исследование фракционного состава протеолитического комплекса ферментного препарата «Протепсин»

Препарат подвергли электрофоретическим и хроматографическим исследованиям для определения фракционного состава белков и идентификации протеолитических фракций в составе комплекса, в том числе обладающих молокосвертывающей активностью.

Предварительно подготовленный к анализу препарат подвергли электрофоретическому разделению методом дискового электрофореза (см. Гл. 2). Как видно на рисунке 3.1 (а), белковый комплекс препарата представлен четырьмя белковыми фракциями, отличающимися подвижностью в среде ПААГ, а следовательно молекулярной массой и величиной поверхностного заряда. Аналогичные данные получены Р.А. Бибишевым (2007 г.).

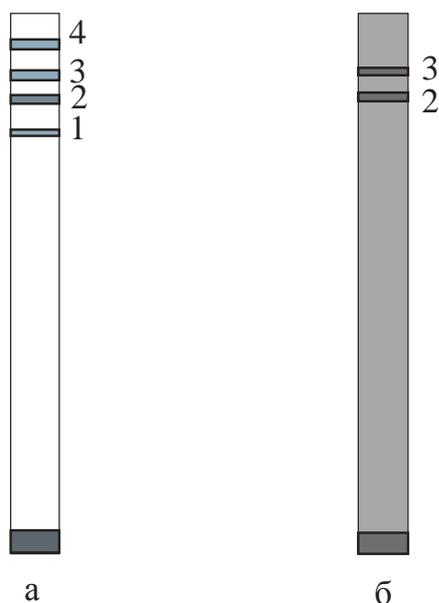


Рисунок 3.1 – Исследование протеолитического комплекса «Протепсин» методом дискового электрофореза: а) фракционирование белков; б) идентификация протеолитических фракций

Идентификация протеолитических фракций по описанному в Главе 2 методу в ПААГ с использованием гемоглобина показала, что в составе белков препарата имеется две протеолитические фракции (рис. 3.1, б). Судя по интенсивности протеолиза гемоглобина в геле, а также различию фронтов при электрофоретическом разделении фракций, протеолитические ферменты отличаются размерами молекул, а следовательно молекулярной массой, величиной поверхностного заряда, структурой и активностью, а также предположительно, содержанием в единице навески препарата.

Хроматография белков препарата на сефадексеG – 100 и идентификация биохимической активности в разделенных фракциях подтвердила результаты электрофоретических исследований.

Дополнительно для идентификации протеолитических ферментов в комплексе препарата «Протепсин» использовали метод экстрагирования белковых фракций из ПААГ с последующим определением протеолитической и молокосвертывающей активностей в каждом экстракте. Результаты показали, что из четырех экстрактов в двух (№2 и №3) обнаружилась общая протеолитическая активность (ПА) и только в одной – молокосвертывающая (МСА). На рисунке 3.2 видно, что молокосвертывающая фракция превалирует количественно. Очевидно, что ферменты протеолитического комплекса различаются величиной поверхностного заряда, молекулярной массой и размерами молекул.

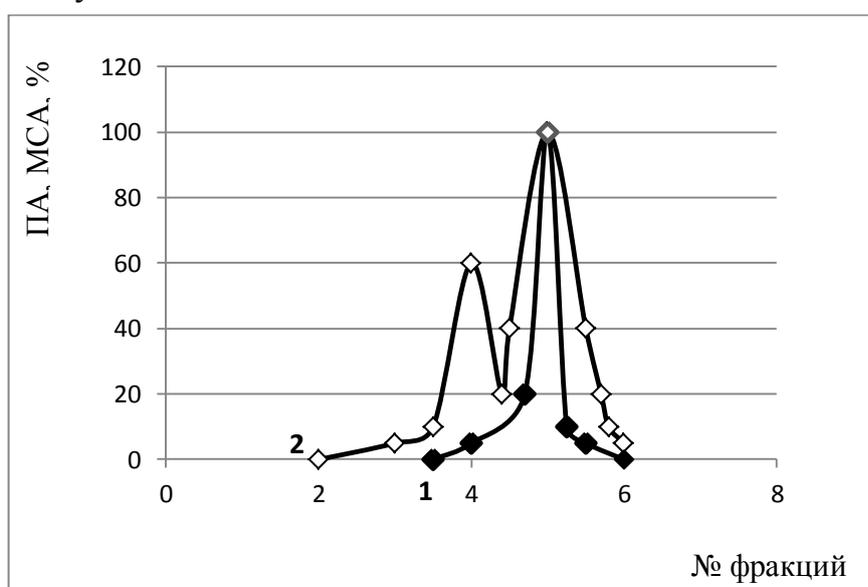


Рисунок 3.2 – Идентификация протеолитических фракций препарата «Протепсин»: —◆— (1) - МСА, —◇— (2) - ПА

Препарат подвергали фракционированию на ДЭАЭ – целлюлозе в условиях, описанных в Главе 2. Результаты приведены на рисунке 3.3, на котором видно, что в белковом составе препарата «Протепсин» также проявляются две протеолитические фракции, одна из которых обладает МСА.

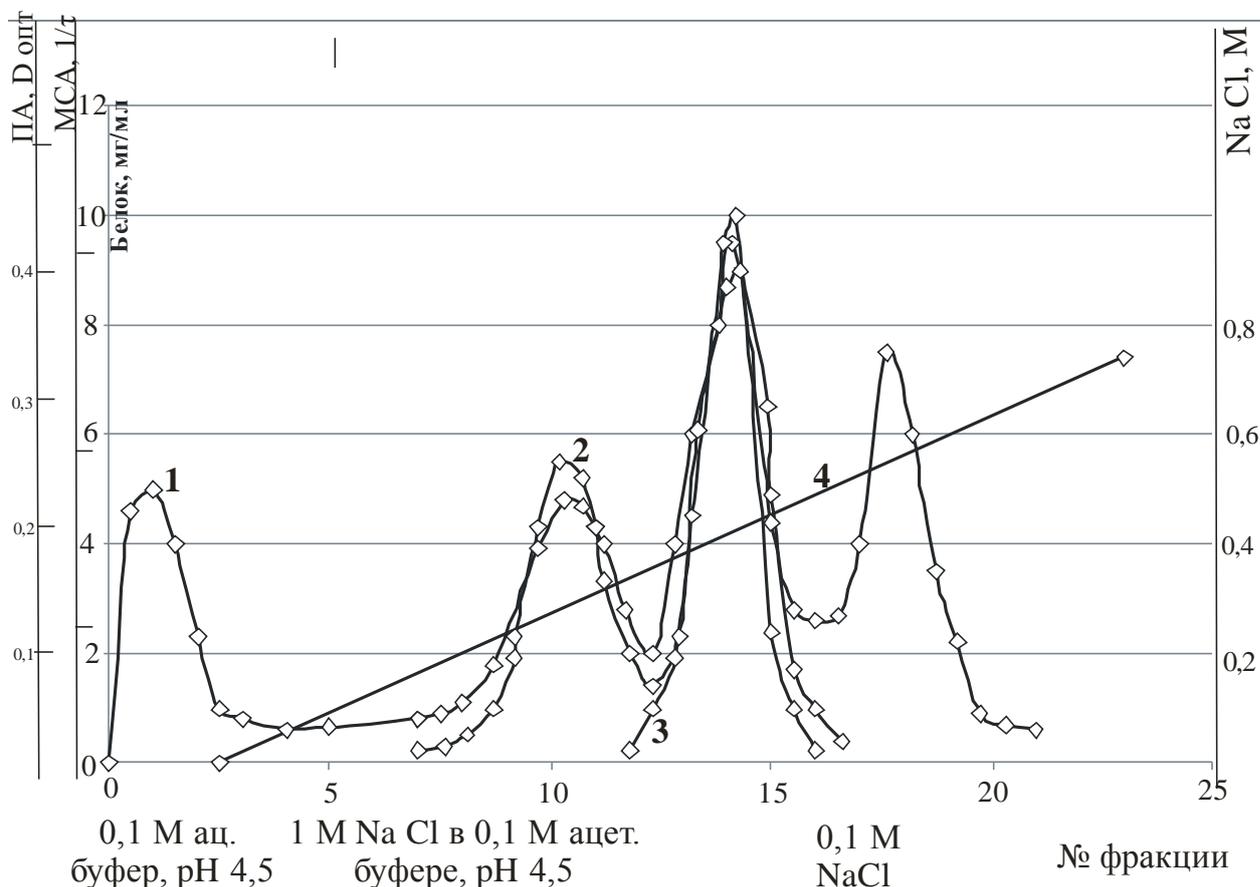


Рисунок 3.3– Хроматография препарата «Протепсин» на ДЭАЭ –целлюлоза: 1 – белок, 2 – ПА, 3 – МСА

Отличительные особенности ферментов протеолитического комплекса препарата «Протепсин» дают возможность разделить и собрать фракции с протеолитической активностью по молекулярной массе, что возможно с использованием сефадекса G – 100 (избран из известной информации о варьировании молекулярных масс кислых протеаз различного происхождения).

Метод гель-фильтрации также доказывает наличие двух фракций с различной молекулярной массой и биохимическими свойствами (рис. 3.4).

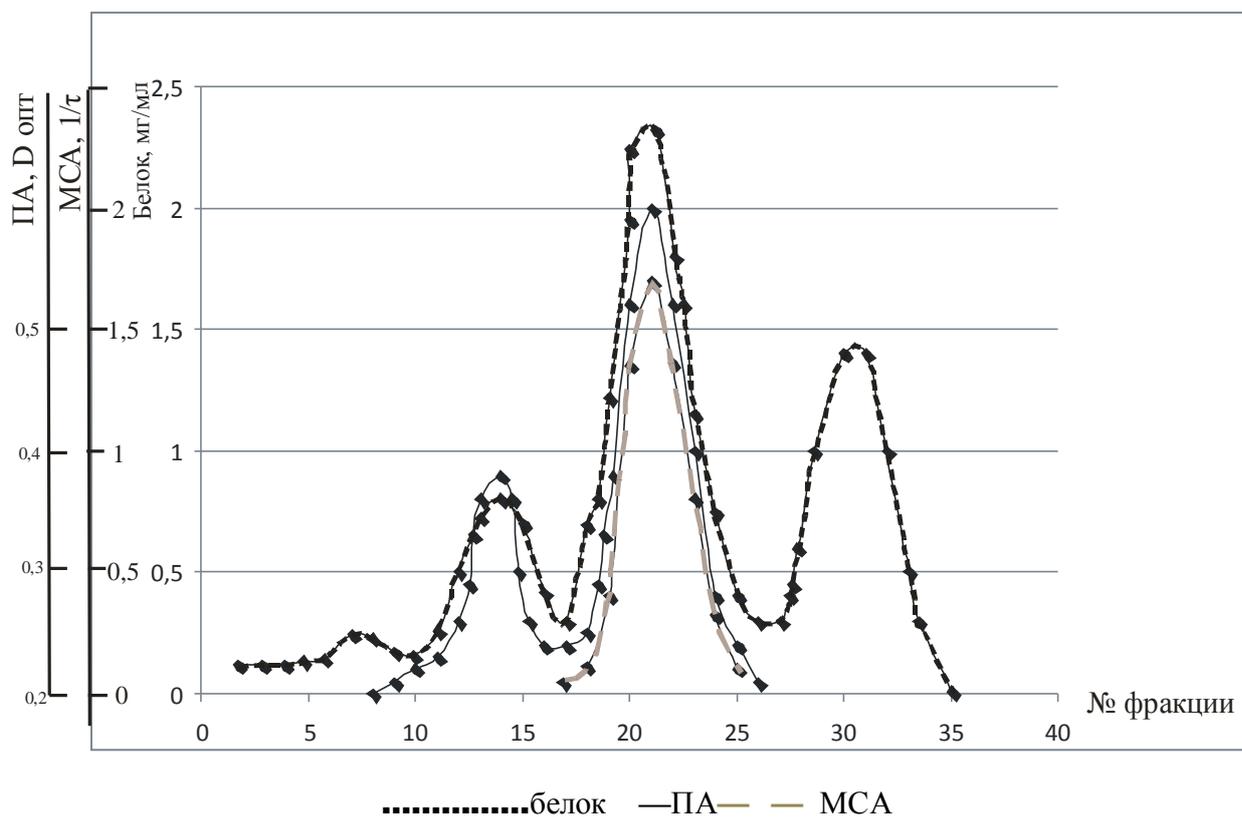


Рисунок 3.4– Хроматография белков препарата «Протепсин»

Фракции протеолитического комплекса объединяли, накапливали количественно и использовали в дальнейших исследованиях. Гомогенность протеолитических фракций доказана нами электрофоретически (рис. 3.5).

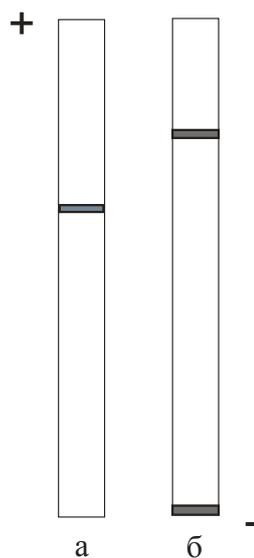


Рисунок 3.5 – Электрофореграмма протеолитических фракций: а – протеиназа I, б – протеиназа II

3.3. Исследование влияния рН и температуры на активность и стабильность ферментов протеолитического комплекса препарата «Протепсин»

Основными факторами управления биохимическими процессами в пищевом сырье и продуктах выступают рН и температура. При определении диапазонов рН и температуры действия ферментов нами введены условные обозначения: фракция №2 на электрофореграмме названа нами протеиназа I, а №3 – протеиназа II. Частные значения рН стандартного субстрата поддерживали с помощью 0,1 М универсального буфера К 2 мл 2%-ного раствора субстрата добавляли по 2 мл растворов гомогенных фракций протеолитического комплекса с содержанием белка 600 мкг/мл. Гидролиз вели при температуре 35°C в течение 30 мин. Результаты определения активности в каждой пробе представлены в виде графической зависимости $A=f(pH)$ (рис. 3.6).

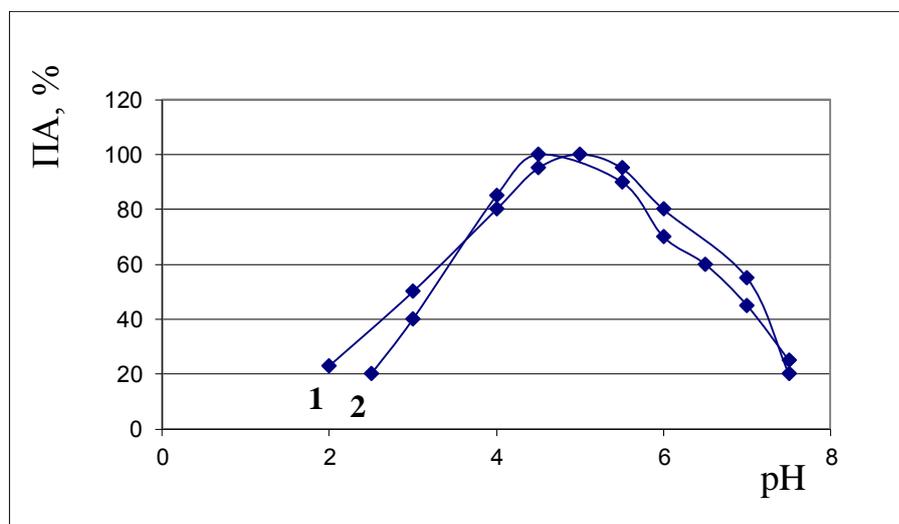


Рисунок 3.6 – Влияние рН на активность ферментов протеолитического комплекса препарата «Протепсин»: 1 – ПА II, 2 – ПА I

Ферменты достоверно различаются рН – оптимумами, при этом протеиназа I имеет максимальное значение активности при рН 4,0-4,5, а протеиназа II – при рН 5,0-5,5.

Аналогичные исследования проводили при воздействии температуры на реакционные смеси. Температуру поддерживали с помощью водяного термостата в диапазоне 20-70°C. Результаты определения ПА в каждом опыте представлены на рисунке 3.7.

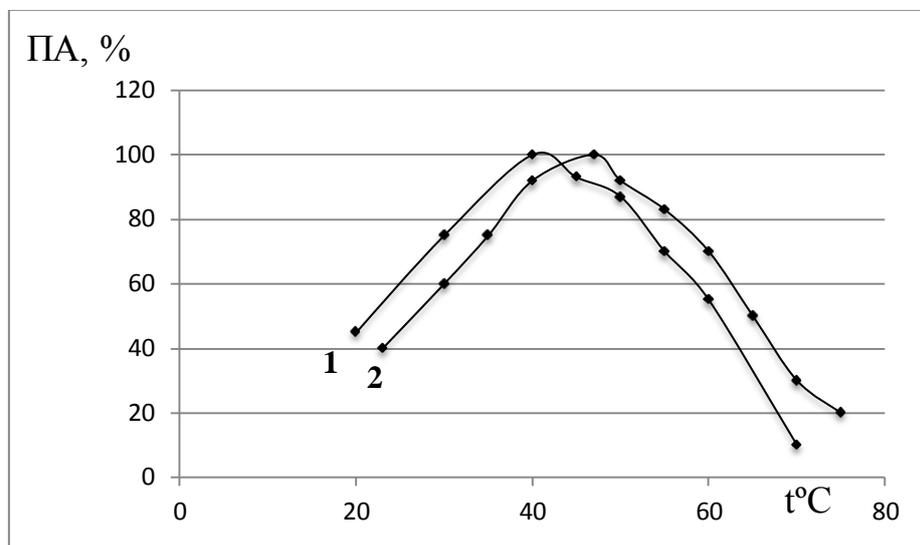


Рисунок 3.7 – Влияние температуры на активность протеолитических ферментов препарата «Протепсин»: 1 – ПА II, 2 – ПА I

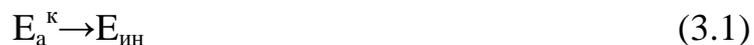
Как видно на рисунке 3.7, оба фермента имеют температурный оптимум действия, характерный для ферментов животного происхождения, при этом протеиназа I наиболее активна при температуре 45°C, а протеиназа II – при 40°C.

Для ферментных препаратов, работающих в пищевых системах, весьма важна информация о пределах активности и кинетике инактивации под воздействием pH и температуры, так как активные протеолитические ферменты в процессе пищеварения могут вызывать нарушения целостности тканей и соответственные заболевания.

Инактивация ферментов под действием H⁺- ионов представляет собой результат предварительных ионизационных процессов, глубоко затрагивающих электростатические взаимодействия в белковой молекуле фермента. При этом, в конечном счете, в каждом элементарном акте инактивации принимает участие

только молекула фермента и именно в ней самой происходит изменение специфической конформации, ведущее к разрушению каталитического центра.

Инактивацию можно представить как мономолекулярную реакцию, протекающую по схеме:



где E_a и $E_{ин}$ – активная и инактивированная форма фермента соответственно; k – константа скорости перехода активной формы в инактивированную.

На примере многих ферментов микробного, растительного и животного происхождения показано, что кинетика их инактивации – реакция первого порядка. На основании расчетов энергии активации ($E_{акт}$) и энтропии (ΔS) сделали вывод о том, что процесс связан с глубокими изменениями нативной конформации.

Реакция первого порядка описывается уравнением:

$$k = \frac{2,303}{\tau} * \lg \frac{a}{a-x} \quad (3.2)$$

где: a – исходная концентрация фермента, которая для мономолекулярных реакций первого порядка выражается в г-моль, в мг белка или азота; $a - x$ – концентрация активного фермента в момент времени (τ).

Учитывая, что активность фермента определяется в строго стандартных условиях, уравнение 3.2 удобно выразить через активность фермента:

$$k = \frac{2,303}{\tau} * \lg \frac{[E_0]}{[E]} \quad (3.3)$$

где: $[E_0]$ – исходная активность (во всех опытах $[E_0]=100\%$); $[E]$ – активность фермента в момент времени (τ); k – константа скорости инактивации (удельная скорость инактивации), характеризующая потерю активности в течение часа ($K, ч^{-1}$). Величину K находили как среднюю арифметическую величину из 5-6 повторностей.

Кислотную инактивацию ферментов препарата «Протепсин» изучали в интервале рН 2,0-7,0 в фосфатно-цитратном буфере с ионной силой 0,05. Во

всех случаях использовали одну и ту же концентрацию ферментов: 600 мкг/мл для ПА и 3 мкг/мл – для МСА. Среды инкубировали при температуре 30°C и через определенные промежутки времени (20-30 минут) определяли ПА и МСА в каждой пробе.

Установлено, что наибольшая стабильность отмечалась при рН 5,0-5,5 для протеиназы II и при рН 4,0-4,5 – протеиназы I. Ферменты значительно теряли активность в слабокислой и около нейтральной средах.

На примере протеиназы II (рис. 3.8) видно, что инактивация по ПА и МСА практически совпадает, что доказывает, что это один и тот же фермент.

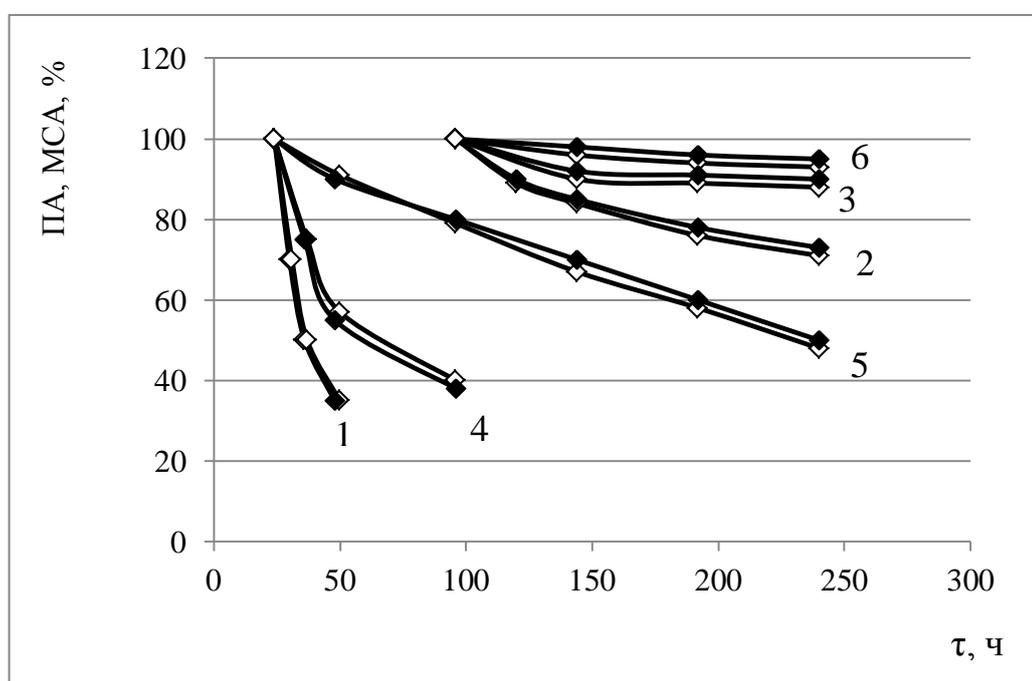


Рисунок 3.8 – Инактивация протеиназы II препарата «Протепсин» в зависимости от времени при температуре 30°C: 1 – рН 7,0; 2 – рН 6,0; 3 – рН 4,0; 4 – рН 2,0; 5 – рН 3,0; 6 – рН 5,0; —◇— МСА, —◆— ПА

На рисунке 3.9 видно, что зависимость $\lg [E_a]/[E]$ от рН является типичной реакцией первого порядка.

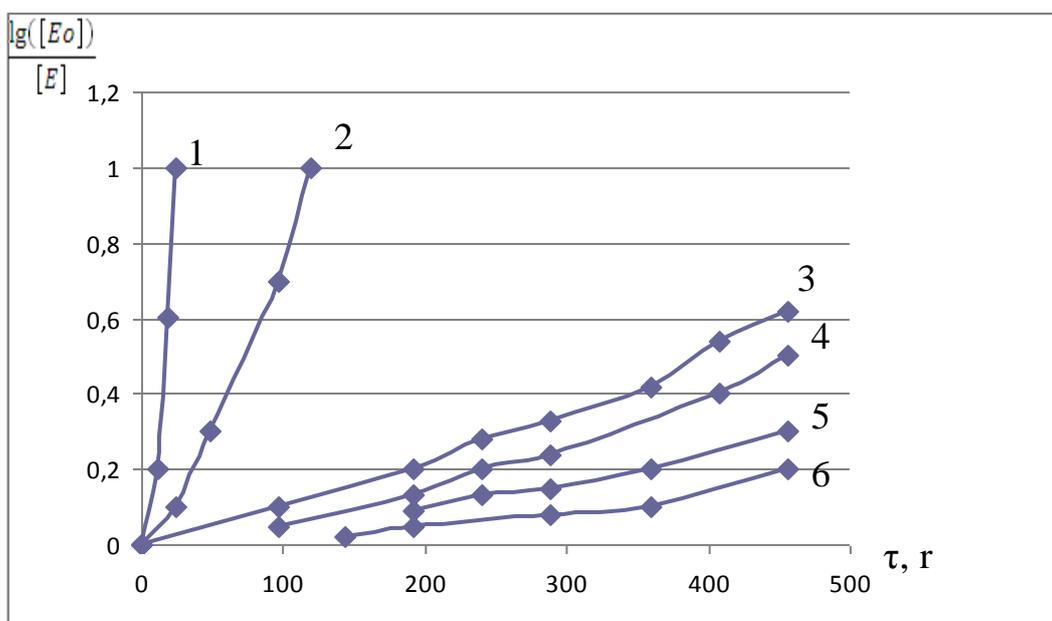


Рисунок 3.9 – Зависимость $\lg [E_a]/[E]$ от рН протеиназы II; рН: 1 – 7,0; 2 – 6,0; 3 – 4,0; 4 – 2,0; 5 – 3,0; 6 – 5,0

Расчетные данные показывают, что область кислотной инактивации протеиназ препарата «Протепсин» максимально приближен к пепсину животных.

Термическую инактивацию протеиназы II изучали в интервале температур 30-70°C в зоне рН4,0-6,0. Так как температура и концентрация H^+ -ионов является тесно связанными и не исключают друг друга факторами интенсивности процесса инактивации, мы предполагали, что термическая инактивация описывается также уравнением первого порядка. Результаты опытов представлены в таблице 3.2.

В опытах ПА инактивируется также как и МСА, что еще раз доказывает то, что это один и тот же фермент.

Таблица 3.2 – Термическая инактивация протеиназы II препарата «Протепсин» при pH 5,0

τ, ч	Температура							
	40°C				50°C			
	ПА		МСА		ПА		МСА	
Е	К*10 ³ , ч ⁻¹							
0	100	-	100	-	100	-	100	-
12	100	-	100	-	65,1	37,0	63,2	38,1
24	92,3	2,33	93,4	2,48	45,2	33,6	42,3	36,0
48	87,8	2,54	88,0	2,54	16,8	37,7	18,1	36,3
96	81,5	2,19	81,0	2,23	7,6	36,8	7,0	37,1
120	77,2	2,36	78,3	2,23	6,7	35,7	6,5	37,7
144	71,4	2,28	75,6	2,16	6,5	33,1	6,0	34,0
168	68,2	2,30	66,3	2,50	5,9	34,1	5,9	34,1
192	60,9	2,54	62,2	2,56	5,2	35,9	5,4	35,9

Влияние температуры на скорость химических реакций описывается уравнением Аррениуса:

$$lg = \frac{E_{акт}}{RT} \quad (3.4),$$

где: $E_{акт}$ – энергия активации реакции, Дж. моль⁻¹; R – газовая постоянная, равная 8,315 Дж. град⁻¹, моль⁻¹; T – абсолютная температура, ° K.

В интегральной форме при $E_{акт} = const$ уравнение имеет вид: lgC_1

$$l_n K = -\frac{E_{акт}}{RT} + lgC \text{ или } lgK = -\frac{E_{акт}}{2,3RT} + lgC_1 \quad (3.5),$$

где lgC – константа интегрирования.

Из последнего уравнения видно, что зависимость Аррениуса $lgK = f \frac{1}{T}$ в прямоугольной системе координат будет представлять прямую с наклоном, определяемым величиной $E_{акт}$. Однако инактивация исследуемого фермента (рис. 3.10) не подчиняется данной зависимости. Как видно на рисунке, каждый график представлен двумя пересекающимися прямыми с различным наклоном к оси абсцисс: одна из прямых соответствует интервалу температур 30-40°C, а другая 40-70°C. Это доказывает белковую природу ферментов, которые в

диапазоне температур более 40-45°C резко теряют активность из-за развивающихся денатурационных процессов.

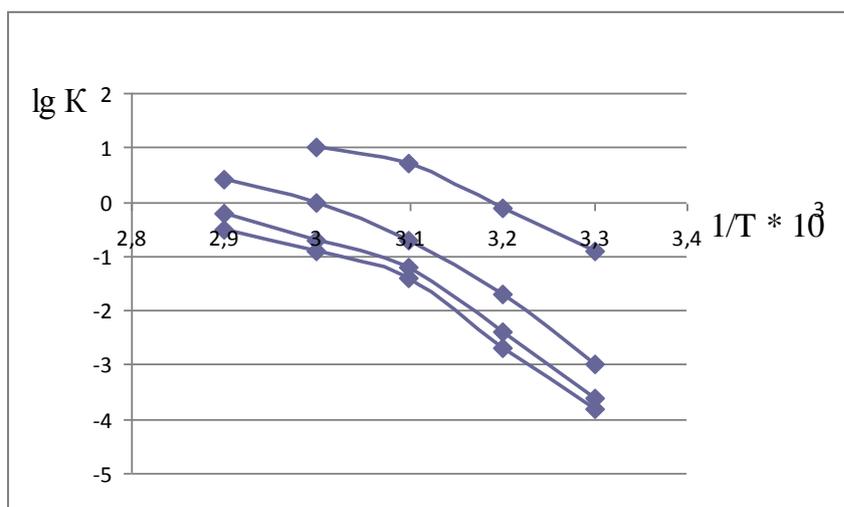


Рисунок 3.10 – Графики Аррениуса $\lg K = f \frac{1}{T}$ протеиназы II препарата «Протепсин»

По данным Р.А. Бибишева [2007] при температуре 72°C препарат полностью теряет активность в течение 5-6 минут, наибольшую устойчивость во времени протеиназы препарата проявляют в диапазоне температур 30-45°C.

Полученные результаты имеют практическое значение, так как определяют условия стабильности и инактивации ферментов препарата и должны быть учтены в технологических процесса производства продуктов животного происхождения.

3.4. Определение молекулярной массы и аминокислотного состава протеаз препарата «Протепсин»

Молекулярная масса большинства кислых протеиназ животного и микробного происхождения характерна сравнительно невысокими значениями (20-40 тыс.).

Различия в подвижности протеиназ препарата «Протепсин» в геле под действием электрического поля позволили применить два подхода в определении молекулярных масс методом электрофореза.

Метод Бузуна [1980] заключается в установлении зависимости фронта фермента в геле от его концентрации. ПААГ готовили в диапазоне от 6 до 15% путем изменения пропорций в смеси при его приготовлении между раствором С (см. Главу 2, акриламид и БИС) и водой. Электрофорез вели в ранее описанных условиях. После окрашивания белковых полос амидочерным и удаления избытка красителя измеряли расстояние, пройденное протеиназами I и II и красителем в геле данной пористости с точностью до 0,5 мм. Далее вели расчет R_m и $100 \lg R_m \cdot 100$. Данные приведены на рисунке 3.11.

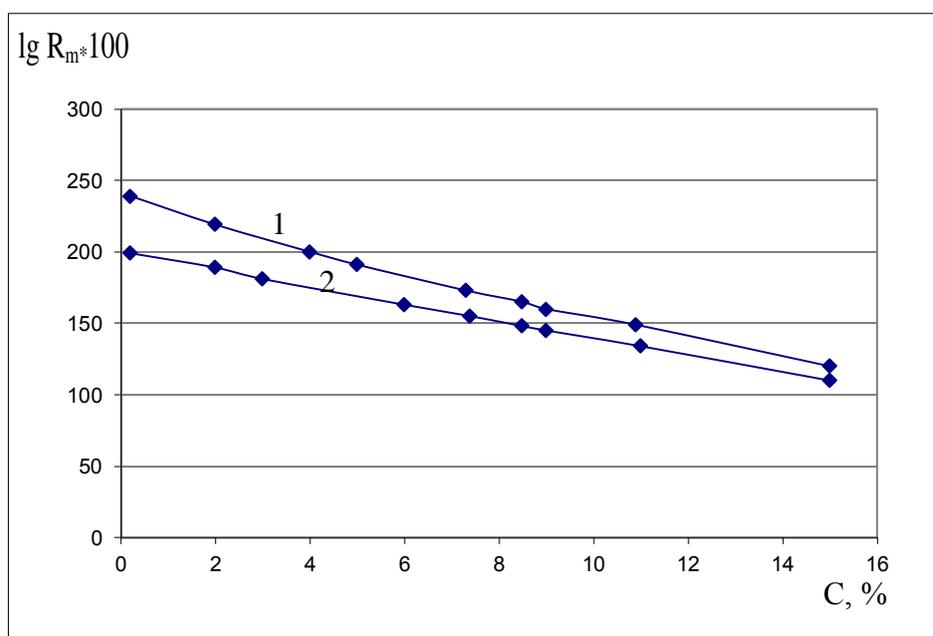


Рисунок 3.11 – Зависимость $\lg R_m$ от концентрации ПААГ. 1 – протеиназа I; 2 – протеиназа II

Как видно на рис. 3.11, для обеих протеиназ зависимость $100 \lg R_m \cdot 100$ от концентрации ПААГ представляет собой прямые линии с различной величиной угла наклона и пересекающимися при концентрации геля, отличной от нуля. Таким образом, ферменты не являются белками-изомерами ни по величине заряда, ни по величине молекулярной массы. Измерив тангенс угла наклона

полученных прямых и воспользовавшись табличными данными, приведенными в прописи метода, находили величины молекулярной массы:

$$tgL_1 = 7,0 \text{ (протеиназа I) – 71600}$$

$$tgL_2 = 5,75 \text{ (протеиназа II) – 36500}$$

Полученные результаты вполне согласуются с литературными данными. При этом протеиназа II особенно близка к пепсину животных.

Второй метод определения молекулярной массы основан на SDS-электрофорезе, который проведен на приборе вертикального электрофореза.

В качестве опытных образцов использовали гидраты препарата «Протепсин» в соотношении с водой 1:1; 1:10; 1:100. Фронт препарата также доказывает его гетерогенность. Подготовленные образцы препарата наносили на дорожки геля. Параметр R_1 , характеризующий подвижность полипептидов в геле, определяли как частное расстояние пройденных анализируемыми полипептидами и фронтом.

На электрофореграмме зарисованы 4 белковые фракции, одна из которых количественно преобладает по сравнению с остальными. Идентификация протеолитических фракций, приведенная выше, и калибровка геля по подвижности маркеров, дает массу протеиназы II ~38-39 КД_а и протеиназы I – 66-68 КД_а. Полученные данные весьма близки с результатами, полученными по методу Бузунаи подтверждают принадлежность ферментов к кислым протеиназам.

Наличие дополнительных полос в спектре препарата можно объяснить, на наш взгляд, следующими причинами: присутствием балластных фракций – сопутствующих ферментов; образованием минорных компонентов при хранении препарата и другие.

Установленные различия в свойствах протеолитических фракций препарата «Протепсин», по всей видимости, связаны со структурными особенностями, заложенными в качественном наборе и последовательности аминокислот, образующих первичную структуру.

Электрофоретически гомогенные протеиназы препарата подвергали гидролизу 6 л НСІв соотношении 1:24 при температуре 105°С в течение 24 часов. Гидролизат упаривали досуха в среде азота, а сухой остаток анализировали на аминоканализаторе марки Hd 1200 Е. Полученные результаты приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Аминокислотный состав протеиназы I и протеиназы II препарата «Протепсин»

Название аминокислоты	Протеиназа I		Протеиназа II	
	Содержание аминокислот			
	%	количество остатков на молекулу фермента	%	количество остатков на молекулу фермента
Лизин	-	-	0,5	1
Гистидин	0,3	1-2	1,1	2-3
Аргинин	-	-	1,1	1-2
Аспарагиновая кислота	15,1	90	16,2	44-45
Треонин	7,2	40-41	10,9	30-31
Серин	4,6	30-31	5,0	16-17
Глутаминовая кислота	12,6	61-62	9,7	22-23
Пролин	7,5	47	1,7	5-6
Глицин	4,5	44-45	6,8	31
Аланин	8,2	65-66	6,8	26
Цистин	0,5	2-3	-	-
Валин	12,0	71-72	14,2	40-41
Метионин	-	-	2,0	4-5
Изолейцин	8,0	44	8,6	23-24
Лейцин	5,6	29-30	10,2	27-28
Тирозин	6,0	25-26	6,6	12-13
Фенилаланин	8,2	51-52	11,4	23-24

Результаты указывают на разницу в содержании глутаминовой кислоты, пролина, сирина, лейцина, фенилаланина, гистидина, аспарагиновой кислоты. Они также различаются числом аминокислотных остатков соответствующих аминокислот. В составе протеиназы I преобладают “кислые” аминокислоты, что видимо, и определяет более низкий рН оптимум действия этого

фермента. Учитывая роль первичной структуры в формировании более высоких пространственных уровней, где третичная определяет функции, можно констатировать разницу в биохимической активности и, например, в отсутствии или наличии молокосвертывающей активности.

3.5. Идентификация функциональных групп активного центра протеолитических ферментов

В расшифровке механизма катализа отправным моментом является идентификация функциональных групп, участвующих в акте катализа. Этот вопрос достаточно глубоко изучен для животных протеиназ, в частности пепсиновых, когда установлены функциональные группы каталитического центра, предложены гипотезы и рабочие модели разрыва пептидных связей. В частности, идентификация карбоксильных групп в активном центре ферментов стала возможной с помощью синтетических реагентов -дiazосоединений, которые специфически взаимодействуют и блокируют COOH- группы, вызывая интенсивную инактивацию ферментов. Определенную роль в идентификации функциональных групп активных центров могут играть величины рК групп. Однако метод нельзя считать надежным из-за образования множественных ковалентных, ионных или координационных связей и индуктивных воздействий соседних групп, вызывающих значительные колебания величины рК.

Для идентификации функциональных групп в активном центре ферментов необходимо совпадение нескольких независимых экспериментальных критериев. Широко для этой цели используется исследование кривых рН – активность и расчет теплот ионизации.

Определение теплот ионизации проводили по уравнению Вант-Гоффа:

$$\Delta H = 2,303R (pK_1 - pK_2) \frac{T_2 T_1}{T_2 - T_1} \quad (3.6)$$

$$\text{или } pK_1 - pK_2 = \frac{\Delta H}{2,303R} \frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \quad (3.7)$$

где: pK_1 и pK_2 – отрицательный логарифм константы ионизации при температурах T_1 и T_2 соответственно в $^{\circ}K$; ΔH – теплота ионизации в кДж моль^{-1} ; R – газовая постоянная.

При T_1 $v_1 = \frac{1}{2} v_{max}$ и соответствует $pH_1 = pK_1$; при T_2 $v_2 = \frac{1}{2} v_{max}$ и соответствует $pH_2 = pK_2$ и в уравнение можно внести pH_1 и pH_2 вместо pK_1 и pK_2 :

$$\Delta H = 2,303 R (pH_1 - pH_2) \quad (3.8)$$

$$\text{или } \Delta H = 2,303 R \Delta pK \frac{T_2 T_1}{T_2 - T_1}, \quad (3.9)$$

где: $\Delta pK = pH_1 - pH_2$

На рисунке 3.12 представлены кривые зависимости активности протеиназы II от pH ($v = f(pH)$), снятые нами при температурах 20 и $45^{\circ}C$; v_t находили по начальным скоростям ферментативного катализа. На рисунке находили величины pK_b “кислой” ветви кривой и pK_a “щелочной”, а также ΔpK_1 для “кислой” и ΔpK_2 для “щелочной” ветвей кривой. На основании этих величин рассчитывали ΔH .

Результаты графо-аналитических расчетов представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Величины pK и ΔH функциональных групп протеиназы II, участвующих в акте катализа

Ветви кривой	pK при температуре, $^{\circ}C$		ΔH , кДж моль^{-1}
	20	45	
“Кислая”	1,68	1,82	9,7
“Щелочная”	3,96	3,76	12,1

Как видно из данных таблицы, величины ΔpK_a и pK_b колебались в пределах 0,18-0,20. Такие малые величины pK свидетельствуют о присутствии карбоксильной группы, теплота ионизации которой наименьшая из всех теплот ионизации ионогенных групп, входящих в белки. Она равна $6,3 \text{ кДж моль}^{-1}$.

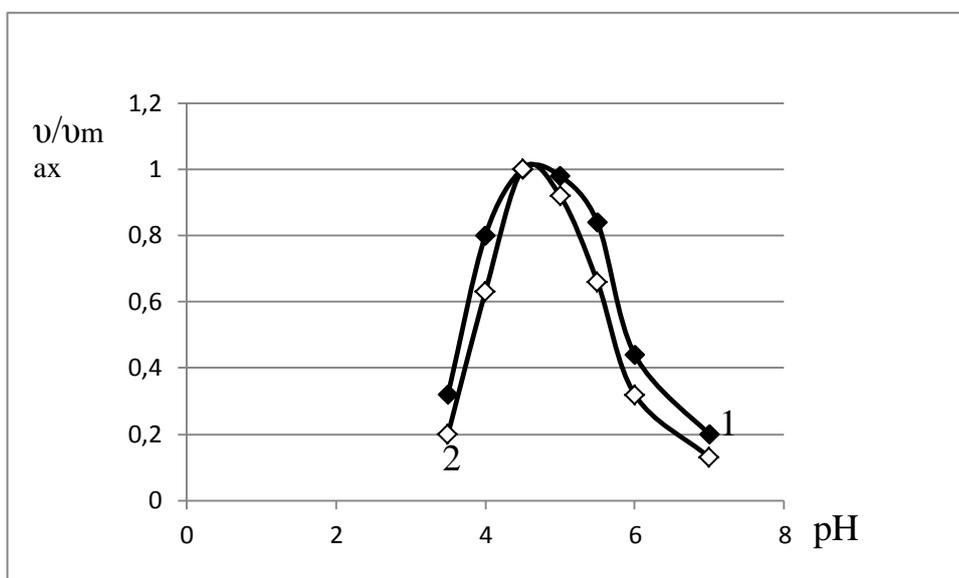


Рисунок 3.12 – Кривые активность – pH протеиназы II. Температура, °С:

1 – 20 (—◆—), 2– 40 (—◇—)

Из сравнения полученных нами величин ΔH с теплотой ионизации COOH – группы видно, что ориентировочно рассчитанные нами теплоты ионизации вполне удовлетворяют этой величине, причем для обеих ветвей кривой, что говорит о возможном наличии в каталитическом центре фермента не одной карбоксильной группы, а нескольких. Нами проведены исследования функциональных групп каталитического центра и другими методами.

Типичной реакцией на имидазол является его фотоокисление в присутствии метиленовой сини. При наличии в каталитическом центре имидазола фотоокисление должно привести к инаktivации фермента. Следует отметить, что на ряду с имидазолом интенсивному фотоокислению подвергается и индольное кольцо триптофана.

Опыты по фотоокислению проводили в плоскодонных колбах емкостью 250 мл так, чтобы слой фермента был достаточно тонким в случае смеси фермента и метиленовой сини (колба I). Вторая колба с ферментом и метиленовой синью находилась в темном месте. Третья колба находилась на рассеянном свете без метиленовой сини. Через каждый час определяли активность протеиназы на гемоглобине (pH 3,0). Условия опыта и результаты представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Влияние фотоокисления на активность протеиназы II

№ п/п	Условия опыта	Метиленовая синь	рН	Активность в % за время инкубации, ч.						
				0	1	2	3	4	5	6
1	Рассеянный солнечный свет	0,000	5,46	100	100	100	100	96,5	86,7	86,2
2	То же	0,005	4,98	100	100	90,6	84,6	51,4	48,4	30,0
3	В темноте	0,005	5,0	100	100	100	100	94,6	86,7	86,2

Как свидетельствуют данные таблицы, исследуемый фермент довольно интенсивно подвергался фотоокислению. За 6 часов он теряет около 70% своей активности. Это вполне определенно указывает на присутствие либо имидазольной группы, либо индольного кольца триптофана. Однако малая величина теплот ионизации ставит под сомнение наличие имидазола в каталитическом центре фермента. Тем более, что в аминокислотном составе исследуемой протеиназы, количество гистидина весьма незначительно, в то время как количество триптофана больше. Иными словами, можно предположить, что в акте катализа важную роль играет и какая-то ароматическая, способная к фотоокислению группа.

Большое значение в идентификации функциональных групп каталитического центра имеет блокировка их специфическими химическими реагентами.

В наших опытах в качестве таких реагентов использовали ЭДТА, 8 – оксихинолин, моноiodуксусную кислоту, п – хлормеркурий-бензонат, глутатион, цистеин, семикарбазид, тиодипропионовую кислоту, тиосульфат натрия, металлический йод, перманганат калия. Растворы протеиназы II, содержащие $5 \cdot 10^{-3}$ М этих соединений, выдерживали в течение 24 часов. Параллельно опытным ставили контрольные. Активность протеиназы определяли на гемоглобине при рН 4,5 через 0,5; 3 и 24 часа.

Как показали результаты опытов, ЭДТА и 8-оксихинолин не оказывали никакого влияния на активность исследуемого фермента, что говорило об

отсутствии в его каталитическом центре какого-либо металла. Не оказывали никакого влияния реагенты на SH – группу: n – хлормеркурий бензоат и моноiodуксусная кислота. Фермент полностью сохранял свою активность и в присутствии специфических реагентов на дисульфидную группу (цистеина, глутатиона, тиодипропионовой кислоты, тиосульфата натрия). Это свидетельствовало о том, что в каталитическом центре протеиназы II не содержится SH – группа, а, следовательно, она не является “тиоловым” ферментом; протеиназа II не является сериновой; а также она не металлофермент.

Иная картина отмечена нами при внесении йода и перманганата калия. За 3 часа активность протеиназы II в присутствии йода снижалась на 50%, а в случае перманганата калия полностью исчезла. Полученные данные свидетельствовали об участии в акте катализа тирозина или триптофана. Это совпадает с некоторыми экспериментальными данными по ингибированию кислых протеиназ микробного происхождения и пепсина.

Однако в настоящее время считают, что эти группы, как указывалось нами раньше, способствуют образованию субстрат-связывающих участков.

К специфическим реагентам относятся и ионы двухвалентных металлов. Известно, что они оказывают ингибирующий или активирующий эффект. Однако данные относительно влияния определенных ионов на активность кислых протеиназ весьма противоречивы.

В наших опытах мы использовали соли двухвалентных металлов в виде хлоридов в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М при pH 4,5 в фосфатно-цитратном буфере. Активность фермента определяли на гемоглобине при pH 4,5 через 0,5, 1 и 3 часа. Ионы Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} практически не оказывали никакого влияния на активность протеиназы II. Лишь в случае Fe^{3+} наблюдался ингибирующий эффект. За 3 часа инкубации фермент терял до 60% своей активности.

Известно, что ионы Fe^{3+} обладают специфически выраженной способностью образовывать прочные внутрикомплексные соединения с тремя

карбокислыми группами поликарбоновых кислот. На основании этого можно предположить, что присутствие ионов Fe^{3+} и лимонной кислоты в виде фосфатно-цитратного буфера вело к образованию аналогичных комплексов и инактивации фермента.

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод, что протеиназа II препарата «Протепсин» содержит в своем каталитическом центре карбокислые группы; большое значение для акта катализа играют, видимо, остатки тирозина, триптофана или имидазола.

3.6. Субстратная специфичность протеолитических ферментов препарата «Протепсин»

Вопросы субстратной специфичности имеют чрезвычайно важное теоретическое и практическое значение. Количественной мерой специфичности ферментных препаратов служит значение константы Михаэлиса – Ментен - концентрация субстрата, при которой конкретный фермент обеспечивает скорость реакции, равную половине максимально возможной в данных условиях. Анализ кинетики ферментативных реакций проводили на основе уравнения Михаэлиса - Ментен:

$$v_o = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}, \quad (3.10)$$

где v_o - начальная скорость реакции при концентрации субстрата S ; v_{max} - максимальная скорость реакции; K_m - константа Михаэлиса-Ментен для данного сочетания «фермент-субстрат».

Для определения K_m использовали графо-аналитический метод Лайнуивера-Бэрка на основе преобразования уравнения 3.10:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{v_{max}}. \quad (3.11)$$

Для изучения влияния концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции в качестве субстрата брали 2%-й раствор

казеинат натрия, водорастворимые и солерастворимые белки мяса, коллаген животного происхождения.

Р.А. Бибишев[2007] и И.С. Косенко [2009] использовали методику (Глава II) выделения соответствующих белковых фракций мяса на основании растворимости. Необходимую концентрацию белков устанавливали путем разведения дистиллированной водой. Для приготовления водной коллагеновой дисперсии коллаген тщательно измельчали в ступке. Навеску измельченного коллагена суспендировали в дистиллированной воде в соотношении, необходимом для достижения конкретной концентрации (для коллагена принимали $M=300000$, влажность – 25%). Смесь выдерживали в течение 2-х часов для набухания коллагена при комнатной температуре.

В эксперименте к 5 см^3 белковой фракции заданной концентрации добавляли 1 см^3 0,1% раствора ферментного препарата и инкубировали при 45°C в течение 10 мин (при гидролизе коллагена – 30 мин). По истечении времени вносили 4 см^3 4% раствора ТХУ и инкубировали 10 минут при 30°C для осаждения оставшегося белка. Смесь фильтровали через бумажный фильтр. В полученном фильтрате определяли количество аминокрупп по нингидриновой реакции. Затем измеряли оптическую плотность при 570 нм относительно контроля (ТХУ вносили сразу после добавления фермента). Количество продуктов гидролиза определяли по калибровочному графику, построенному по L – лейцину. Скорость реакции рассчитывали по формуле:

$$v = A \cdot 1000 / \tau \cdot 10, \text{ мкмоль экв./дм}^3 \text{ мин}, \quad (3.12)$$

где: A – количество продуктов гидролиза, эквивалентное 1 мкмоль L -лейцина;

τ – продолжительность гидролиза, мин;

10 – степень разведения;

1000 – коэффициент пересчета см^3 в дм^3 .

Расчеты позволили установить величину K_m (мк моль): казеинат натрия – $3,2 \cdot 10^{-4}$; водорастворимая фракция белков мяса – $8,4 \cdot 10^{-4}$; солерастворимая фракция белков – $12,5 \cdot 10^{-4}$; коллаген – $2,0 \cdot 10^{-3}$. По уровню субстратной

специфичности протеиназы Препарата «Протепсин» прослеживается убывающий ряд: солерастворимая фракция белков мяса \leq водорастворимая фракция белков мяса < казеинат натрия < коллаген, что можно использовать для обоснования путей рационального использования препарата. Однако нельзя игнорировать и способность ферментов препарата «Протепсин» к гидролизу коллагена, который весьма полезен для мягчения мяса. Таким образом, по действию на белки мяса препарат «Протепсин» следует отнести к комплексным.

В качестве субстратов в наших опытах использовались: гемоглобин, казеин и желатин в виде 2%-ых растворов. Фермент добавляли в субстраты из расчета 300-400 мкг/мл. Гидролиз вели в оптимальных условиях действия препарата (рН 5,0, температура - 40°C). Об относительной ПА судили по нарастанию оптической плотности (ΔD). Данные представлены на рисунке 3.13.

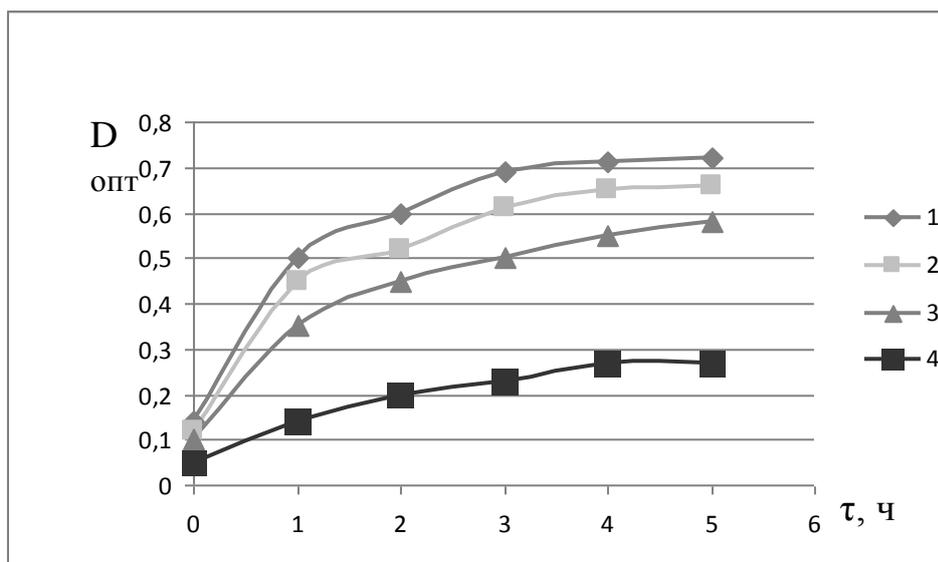


Рисунок 3.13 – Гидролиз белков протеиназой II препарата «Протепсин»: 1 – альбумин, 2 – гемоглобин, 3 – казеин, 4 – желатина, ось ординат – оптическая плотность, ммк

Лучшими субстратами были альбумин, гемоглобин, казеин. Максимальная степень гидролиза гемоглобина была 65-68%. Близкие результаты дал гидролиз альбумина. Степень гидролиза была на 5-8% больше по сравнению с гидролизом гемоглобина. Казеин занимал среднее положение между гемоглобином и желатиной. Степень его гидролиза была равна 50-55%.

При этом довольно заметно шло расщепление белка в течение первых 4-х часов.

Анализ специфичности протеиназы II при действии на белки показал, что они неравноценны с точки зрения разрыва пептидных связей.

Однако проверка субстратной специфичности на белках затрудняет решение вопроса о разрыве каких-либо определенных связей. С этой точки зрения более приемлемыми субстратами являются синтетические пептиды.

В опытах мы использовали синтетические субстраты: DL- α -аланин – DL – аспарагин, DL – аланил-метионин. DL – α – аланил-триптофан, аланил-глицил-глицин, глицил – DL – β – финилаланил, бензоил – β – аланин. Субстраты готовили в виде 0,01% растворов на фосфатно-цитратном буфере с рН 3,0, а конечная концентрация фермента была равна 300 мкг/мл. Гидролиз вели при температуре 40°C в течение 5 часов. Об относительной пептидазной активности судили по изменению величины оптической плотности растворов и выражали в % относительно контрольного образца. Результаты показаны на рисунке 3.14.

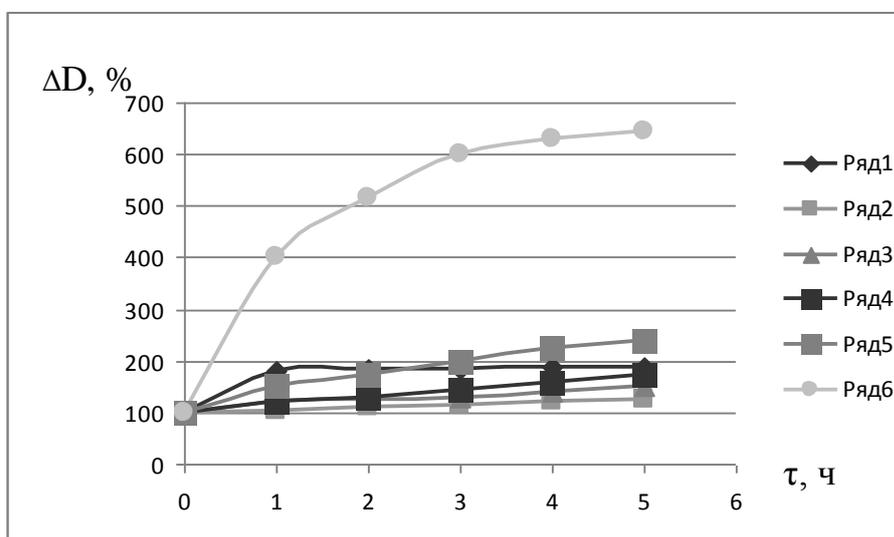


Рисунок 3.14 – Гидролиз синтетических пептидов протеиназой II препарата «Протепсин»: 1 – ала-асп; 2 – ала-мет; 3 – гли-фе; 4 – ала-три; 5 – ала-гли-гли; 6 – бенз-ала; ось ординат – изменение оптической плотности в % к контрольной

Как видно на рисунке, протеиназа II обладает ярко выраженной субстратной специфичностью. При этом в наименьшей степени гидролизовалась связь ала-мет, гли-фе, ала-асп. Более интенсивный гидролиз наблюдался в случае трипептида ала-гли-гли и особенно дипептида ала-три. К 5 часам инкубации гидролиз трипептида в основном заканчивался, тогда, как скорость гидролиза пептидной связи ала-три оставалась постоянной. Ярко выраженной активностью протеиназы II была в случае расщепления связи бенз-ала. Скорость реакции и степень гидролиза бензоил – β – аланина была несравненно выше, чем во всех остальных случаях. Видимо, каталитический центр протеиназы II имеет сродство к гидрофобным участкам молекулы субстрата.

Такая специфичность действия исследуемого фермента была сходна с пепсиновой группой протеолитических ферментов.

ГЛАВА IV. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ПРОТЕПСИН» НА СВОЙСТВА МЯСНОГО И МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

Углубленное изучение физико-химических и биокаталитических свойств препарата «Протепсин» указывает на перспективность при воздействии на белковые субстраты животного происхождения. Однако, учитывая гетерогенность и сложность строения животных белков, следует провести исследование действия ферментного препарата на реальные мясные субстраты, включая с высокой долей соединительнотканых белков, а также молочные среды. При этом весьма важно достижение высокого качества, а с учетом современных тенденций развития перерабатывающих отраслей АПК и обеспечение высокой пищевой и биологической ценности продуктов, а также их безопасности.

В большинстве случаев эти показатели определяются составом сырья, изменениями соотношения биополимеров и уровнем их гидратации, реологическими свойствами в процессе технологической обработки. В настоящее время особую актуальность приобретают используемые аддитивы, включая пищевые и биологически активные добавки, а также целенаправленное воздействие внешних факторов в достижении заданных свойств готовых продуктов.

4.1. Микроструктурные и функционально-технологические свойства обработанного ферментами мясного сырья

В практике промышленных предприятий получили распространение различные способы применения ферментных препаратов для обработки мясных систем, среди которых особой популярностью пользуются способы шприцевания, массирования и комбинированные. При обработке сырья в производстве цельномышечных мясных продуктов они оказались наиболее часто встречающимися и практически применимыми.

В качестве сырья использовали говядину I,II сортов, а также шкуру свиную, субпродукты и побочные продукты, полученные в процессе жиловки мяса в колбасном и полуфабрикатном производствах.

При действии ферментов на мясные системы возникают сложные биохимические процессы, приводящие к образованию сложной композиции биополимеров различной молекулярной массы, что приводит к изменению свойств исходного сырья.

В анализе мясных основ наиболее объективным и иллюстративным методом определения глубины и активности действия ферментов является микроструктурный. Метод дает на ранних стадиях установить изменение структуры тканей, клеток, биополимеров, что дает реально управлять технологическими процессами путем воздействия внешних факторов и прогнозировать уровень качества и потребительских свойств, пищевую и биологическую ценность.

При приготовлении рассолов использовали кристаллическую поваренную соль (5%), каррагинан (1%), белки СУПРО (4%), ветчина В (4,5%) и сухой ферментный препарат «Протепсин» пищевой дополнительно вводимый в состав рассола (0,015%) с исходной активностью 100 ед/г. Контролем служил рассол без ферментного препарата. После полного растворения компонентов рассол вносили в конические колбы вместимостью 250 мл и обрабатывали в условиях, имитирующих посол в массажере (на вибровстряхивателе) при температуре 0-4°C. Исследования проводили на говядине I и II сортов в течение 6-8 часов. Микроструктуру наблюдали с помощью метода, описанного в главе II с использованием микроскопа ЮМAM при увеличении 10*10.

Результаты подтвердили ранее полученные данные о действии препарата на тканые и клеточные структуры мяса. В контрольных образцах мяса говядины I и II сортов соединительная ткань сохраняется, практически отсутствует фрагментирование мышечных волокон (рис. 4.1), сохранившиеся ядра мышечных клеток вытянуты, среди них встречаются истонченные.

В отличие от говядины I сорта в говядине II сорта отмечается волокнистая структура и рыхлость волокон (рис. 4.2). Данное обстоятельство может быть связано со сроками хранения и активностью лизосомальных ферментов.

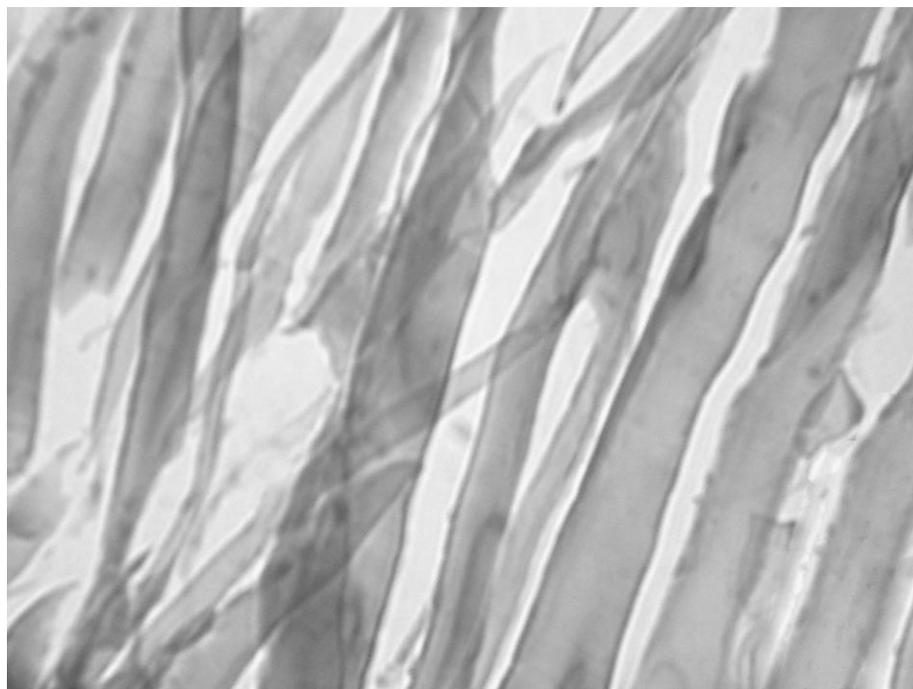


Рисунок 4.1 – Микроструктура мяса говядины I сорта при посоле без использования ферментов Ок. $\times 7$, об. $\times 40$ (цена деления 10 мкм)



Рисунок 4.2 – Микроструктура мяса говядины II сорта при посоле без использования ферментов Ок. $\times 7$, об. $\times 40$ (цена деления 10 мкм)

В отличие от контрольных образцов, в опытных имеются изменения структуры, доказывающие степень и характер воздействия препарата: мышечные волокна набухшие, что характерно для созревшего посоленного мяса, отмечается уменьшение толщины соединительнотканых оболочек. При обработке говядины I сорта ферментным препаратом «Протепсин» волокнистая структура сохраняется, на отдельных участках отмечается фрагментация и разбухание (рис.4.3). В отдельных случаях наблюдалось неравномерное восприятие волокнами оксифильной окраски, отсутствуют элементы соединительной ткани.

В опытах с говядиной II сорта при обработке препаратом отмечалось усиленное разрыхление структуры мышечных волокон, их деформация, практически полное отсутствие соединительнотканной стромы и рыхлой соединительной ткани (рис. 4.4).



Рисунок 4.3 – Микроструктура мяса говядины I сорта при посоле с использованием ферментного препарата «Протепсин» Ок. $\times 7$, об. $\times 40$ (цена деления 10 мкм)

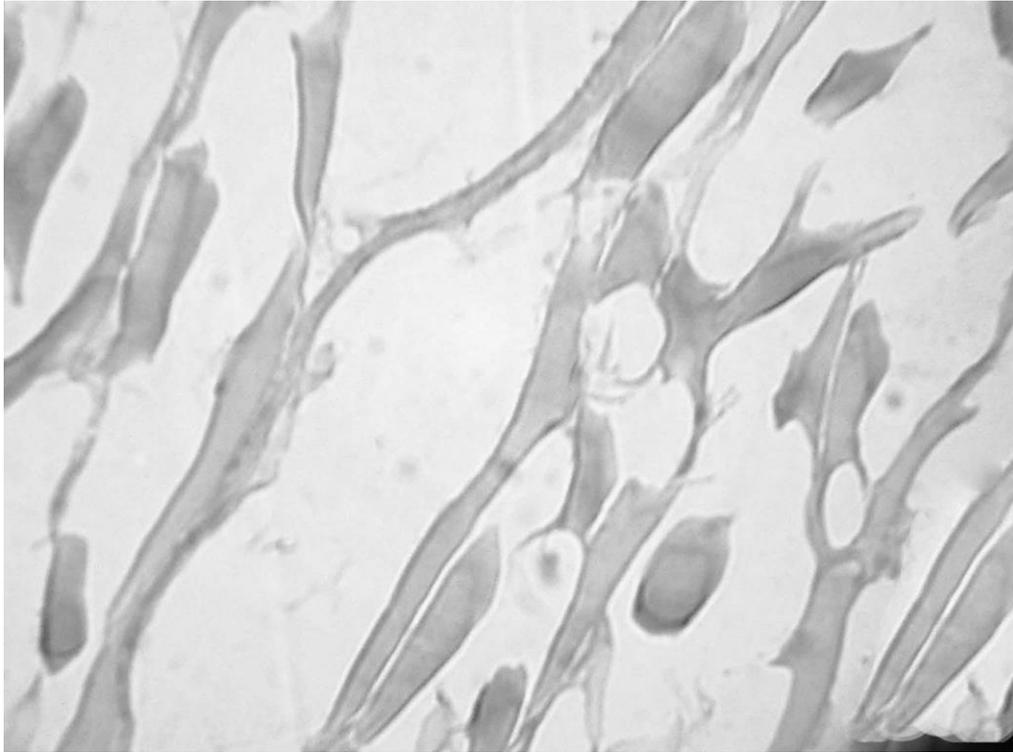


Рисунок 4.4 – Микроструктура мяса говядины II сорта при посоле с использованием ферментного препарата «Протепсин»Ок. $\times 7$, об. $\times 40$ (цена деления 10 мкм)

Микроструктурные исследования показывают, что ферментный препарат «Протепсин» усиливает действие лизоосомальных ферментов, что позволяет закончить посол и созревание за 6-8 часов, что в 1,8-2,5 раза меньше, чем при традиционном посоле.

При обработке фаршевых мясных систем наиболее важным является значение функционально-технологических свойств, формирующих консистенцию и выход продукта. Они определяют в конечном итоге потребительские свойства продукта и его качество.

Влагосвязывающая способность (ВСС) формируется за счет белков мясного сырья, которые поглощают и удерживают воду путем образования гидратных оболочек для формирования водородных связей и электростатических взаимодействий. Стимулируют влагосодержание наличие в среде поваренной соли, а также соответствующих аддитивов - пищевых добавок, например, белковой природы. При этом следует отметить важность рН-фактора, так как белки в ИЭТ значительно теряют способность связывать воду.

В эксперименте также использовали говядину I и II сорта, так как интерес представляло исследование возможности и целесообразности применения препарата «Протепсин» для обработки мяса с невысокой и высокой массовой долей соединительной ткани. Сырье использовали в цельномышечном состоянии и в измельченном (3-4мм) состоянии после 24 часов после убоя и хранения при 0-4°C. Образцы массой 100г обрабатывали солевыми растворами (2,5%) с добавлением и без использования ферментного препарата. В фарши вводили растворы 10% от массы образцов. Образцы обрабатывали на вибровстряхивателе в режиме: 15 минут - работа, 15 минут-покой при температуре 10-12°C, а затем измельчали и определяли ФТС. Образцы анализировали на ВСС и влажность.

В результате проведенных исследований отмечен различный характер воздействия посола с использованием ферментного препарата «Протепсин» и без него. Установлено, что без использования ферментного препарата «Протепсин» ВСС закономерно возрастала вплоть до 12 часов и более. В случае использования препарата ВСС заметно снижалась после 6-8 часов. ВСС без использования ферментного препарата достигала 73-78% за 12 часов посола, а с применением 80% - за 6-8 часов. Снижение ВСС при продолжительности посола более 6-8 часов, по всей видимости, связано с глубоким гидролизом белков мышечной ткани, ответственных за влагоудержание, а также снижением рН за счет развития автолитических процессов и перехода белков в электронейтральное состояние поверхностного заряда.

Результаты, полученные на измельченном сырье отслеживали те же тенденции, что и на цельномышечном лишь с разницей нарастания ВУС за более короткое время, что логично связано с ростом площади контакта поверхности субстата с ферментами препарата. Максимальный уровень составил 76% (для мяса первого сорта) и 71% (для мяса говядины второго сорта) за 5-6 часов обработки.

Влагоудерживающую способность (ВУС) определяли с помощью жиромера, которая указывает на способность мясной системы удерживать воду после

нагрева. Установлено, что аналогично ВСС отмечено увеличение показателя как на цельномышечных образцах, так и на измельченных. Максимальные величины отмечены за 4-5ч обработки с использованием ферментного препарата в составе рассола, затем показатель резко снижался в обоих случаях.

Весьма существенно увеличилась эмульгирующая способность при обработке мяса говядины I и II сортов. Она соответственно составила 77 и 73%, что на 17 и 11 % выше контроля. О стабилизации качественных показателей возможно судить по стабильности эмульсии, то есть по способности удерживать жир после термической обработки, что исключает образование жировых отеков, например, в технологии вареных колбас.

В ходе экспериментальных исследований установлено, что при обработке исследуемых мясных изделий эмульгирующая способность в случае использования ферментного препарата на 20-25% выше, а стабильность эмульсии на 4-5%. По всей видимости, это связано с тем, что в процессе гидролиза белков образуются продукты с гидрофобными и гидрофильными радикалами, свойства которых сходны со свойствами ПАВ, что стимулирует образование мясных эмульсий и является гарантом хорошего качества продуктов.

К полученной информации можно добавить результаты исследования, полученные Р.А.Бибшиевым (2007г.), которые свидетельствуют о стабилизации реологических показателей мясных систем в результате воздействия ферментного препарата. В частности, автор указывает, что в процессе созревания и посола мясного сырья могут возникать непрочные структуры, образующие высокопластичные студнеобразные массы высокой вязкости, обладающие адгезионными свойствами. Это связано со значением липкости мясного фарша. Липкость играет большую роль в процессе формирования и характеризует способность образовывать монолитную структуру в процессе тепловой обработки. Показано, что в присутствии поваренной соли существенно повышается липкость фаршевых систем, достигая значений 75 ПА. Этим же автором показано значительное снижение усилия резания вдоль и

поперек волокон, что дает основание констатировать увеличение усвояемости мясных продуктов с увеличением эффекта биодоступности коллагеновых белков, известных как низкоусвояемые.

Обобщение имеющихся и собственных результатов исследования позволяет логично заключить, что препарат весьма перспективен для обработки мясного сырья, так как он синеричен катепсинам лизосом, физиологичен для человека, полностью инактивируется в диапазонах pH и температуры при обработке мясного сырья в технологиях вареных, полукопченых и варено-копченых колбас, сосисок, сарделек, консервов, ливерных колбас и зельцев. С его применением может быть связано как ускорение процессов созревания и посола, а также мягчение, расширяющее области использования коллаген- и эластинсодержащего сырья.

4.2. Количественная характеристика микрофлоры мяса в процессе ферментной обработки

В ходе экспериментальных исследований, представленных в главе III, показано, что ферменты препарата «Протепсин» действуют непосредственно на белки, а затем проявляют и пептидазную активность и образуют аминокислоты - наиболее усвояемую форму человеком и микроорганизмами. В связи с этим представляло интерес оценить микробиологические характеристики в ходе созревания и посола. Актуальность исследований в этом направлении тесно связана с уровнем биобезопасности сырья, влияющего непосредственно на свойства готовых продуктов. Пробы в условиях посола анализировали с использованием традиционных методов определения КОЕ. Сущность заключается в способности мезофильных аэробов и факультативных анаэробов развиваться на питательном агаре при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с образованием колоний, видимых при увеличении 5х. Из каждой пробы брали не менее двух посевов, различных по объему, взятых с таким расчетом, чтобы на чашках Петри выросло от 30 до 300 колоний. При этом на одну чашку

проводили посев 0,1г, а на другую- 0,01г продукта. Отбирали 1см³, переносили в стерильную чашку Петри. После внесения разведенной анализируемой взвеси чашку заливали 12-15 см³ расплавленного и охлажденного питательного агара и смешивали компоненты. После выдержки в течение 48 ч при температуре 37°С подсчитывали число колоний. Контролем служили пробы, традиционно поселенные без использования ферментного препарата при 4°С, опытом – биомодифицированное посоленное сырье при той же температуре в течение 6 часов (рис.4.5).

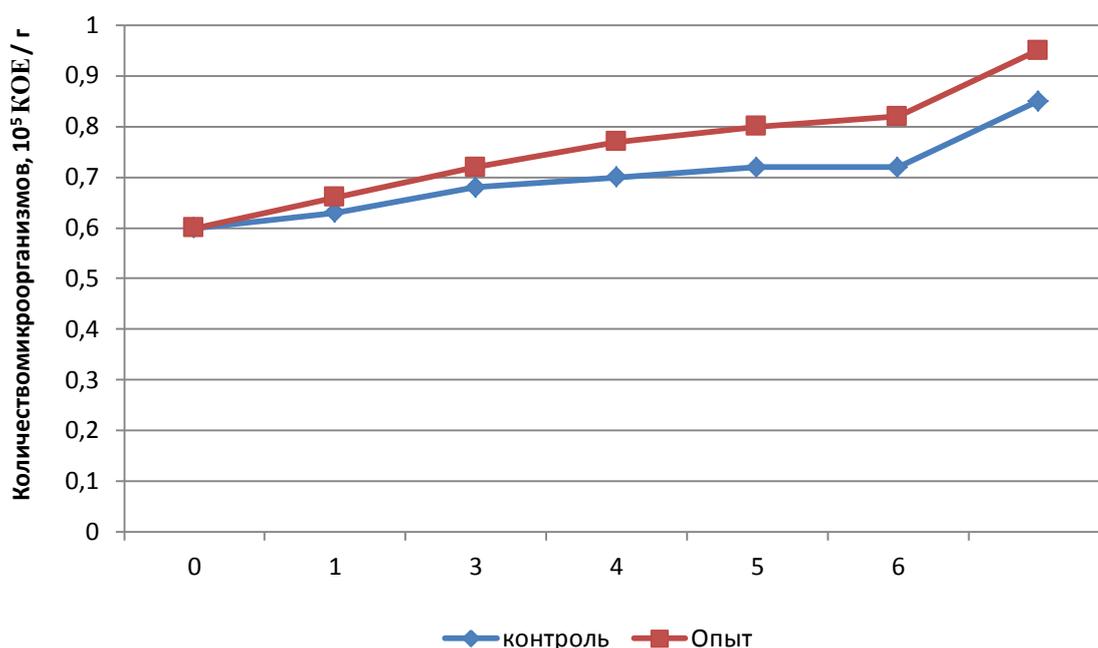


Рисунок 4.5 – Динамика общего числа микробных клеток

На рисунке 4.5 видно, что опытные образцы характерны более интенсивным ростом клеток, особенно заметно возрастающим к 4-5 часам, когда отмечается наибольшее ВСС, ВУС и др., что доказывает интенсивность распада белковых веществ до низкомолекулярных продуктов. Однако требование нормативных документов при этом не нарушаются, а после термической обработки вегетативные формы микроорганизмов в 10 раз ниже, чем в опытных образцах.

Опытные образцы проверялись на обнаружение бактерий группы кишечной палочки в глубине продукта. При этом 0,1 см³ взвеси наносили на

поверхность мясо - пептонного агара и среды Эндо при распределении взвеси по всей поверхности равномерно. После суточного термостатирования изучали морфологию выросших колоний. Подозрительные подвергали дополнительному исследованию- окрашиванию по Граму и микроскопировали. Идентификацию в отдельных случаях проводили по биохимическим и серологическим свойствам. Метод основан на способности кишечной палочки расщеплять глюкозу и лактозу. При этом в специфических средах (ХБ, Хейфеца, Кода) образуются кислые продукты и газы. Результат фиксировался в виде окрашивания сред в желтые и салатно-зеленый цвета. Результаты разносторонних методов дали отрицательный результат по идентификации бактерий группы кишечной палочки. Таким образом, экспериментально доказана безопасность мясных продуктов, принятые технологических режимыобеспечивают их благополучие.

4.3. Цветность мясных фаршей в зависимости от сорта и ферментной обработки говядины

Известно, что потребительские свойства продуктов тесно связаны с формированием органолептических показателей, таких как, прежде всего, запах, вкус и цвет.

Цвет, как известно, зависит от содержания миоглобина и гемоглобина в сырье, которые ответственны за цвет, так как являются природными пигментами. В сыром мясе, взаимодействуя с нитритом, они обеспечивают цвет после термической обработки. При анализе опытных и контрольных образцов использовали метод, описанный в главе II. Результаты анализа посоленных образцов мяса говядины I и II сорта традиционным способом и модифицированным представлены на рисунке 4.6.

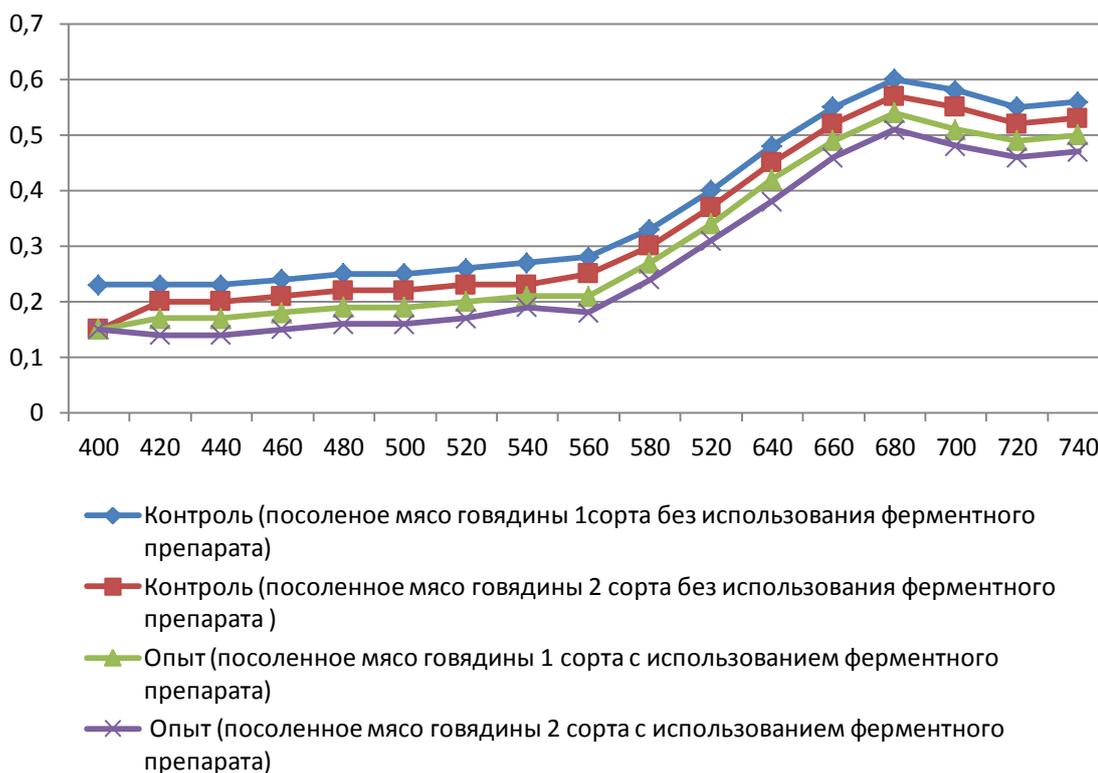


Рисунок 4.6 – Спектры отражения посоленного сыря

Анализ кривых отражения показывает, что спектры образцов близки, однако опытные отличались светлотой и желтизной. На наш взгляд, это связано как с высоким содержанием соединительнотканых белков, не имеющих красных пигментов, так и со спецификой гидролиза пигментов под действием ферментного препарата. Однако это различимо для прибора, а для человеческого глаза эта разница находится за пределами чувствительности.

4.4. Перевариваемость исследуемых мясных систем

Коллаген-белок соединительной ткани, популярность которого возрастает с каждым годом из-за открытия новой его роли как пищевого волокна в питании. Однако нативный коллаген обладает низкой функциональностью в пищевых системах и требует предварительной обработки для увеличения объемов его использования. Поэтому управляемый гидролиз с получением продуктов заданного состава и уровня функционально-технологических свойств может увеличить его усвояемость с одновременным увеличением объемов его использования. Представляло интерес изучить изменение атакуемости гидролизованных белков мяса говядины I и II сорта под действием ферментных препаратов пищеварительного тракта в опытах *invitro* (см. Главу II). В ходе экспериментальных исследований установлено, что на первом этапе опытные образцы характеризовались большим уровнем протеолиза под действием пепсина, на II этапе протеолиз был менее выражен количественно. В целом опытные образцы отличались лучшей перевариваемостью (рис. 4.7), а значит биологической ценностью.

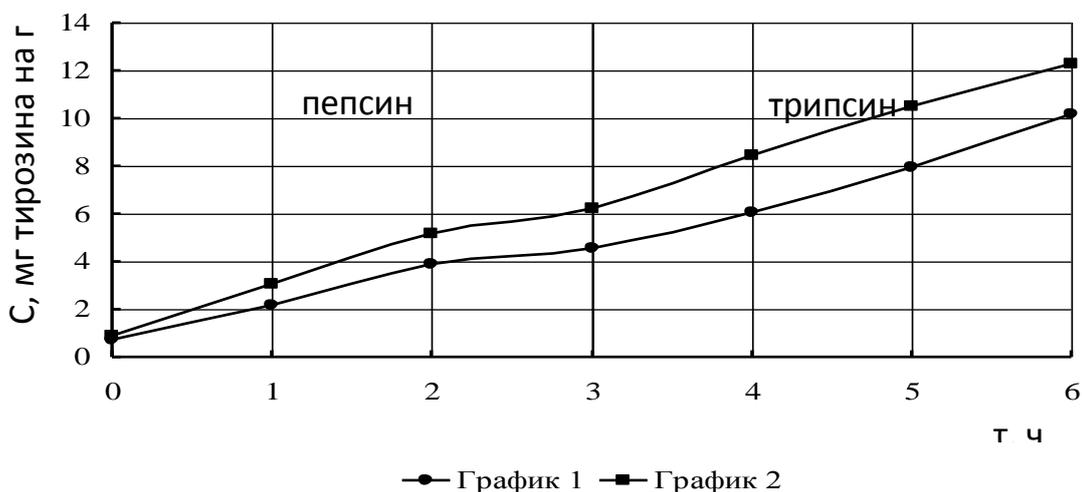


Рисунок 4.7 – Перевариваемость вареного мяса говядины I и II сорта после посола с использованием и без использования ферментного препарата «Протепсин»

Это, на наш взгляд, является ещё одним доказательством комплексного воздействия ферментного препарата «Протепсин» на все группы мясных белков.

4.5. Действие препарата «Протепсин» на белки молока

Несмотря на то, что применение животных пепсинов в технологиях молочных белковых продуктов, таких как творог, сыры, пасты и др. известно достаточно давно, ограниченность технологий связана с глубоким и неспецифическим гидролизом белков молока с образованием горьких продуктов гидролиза, которые снижают потребительские свойства, сокращают сроки хранения готовых изделий. Предложены различные модификации условий превращения казеина молока с целью нивелирования недостатков. Однако данные относительно куриного пепсина крайне недостаточны. Представляло интерес провести некоторые исследования на молочных субстратах в сравнении с сычужным ферментом для оценки перспектив применения препарата в технологии молочных продуктов, так как препарат «Протепсин» (по данным производителя) обладает молокосвертывающей активностью (МСА) и способностью гидролизовать белки молочной сыворотки.

При исследовании влияния внешних факторов на уровень активности ПА и МСА соответственные субстраты нагревали до заданной температуры, а рН-с использованием НС₁ при контроле рН потенциометрически или приготовлением субстрата на фосфатном буфере соответствующего рН. Влияние температуры на МСА препарата «Протепсин» и сычужного фермента представлено на рисунке 4.8.

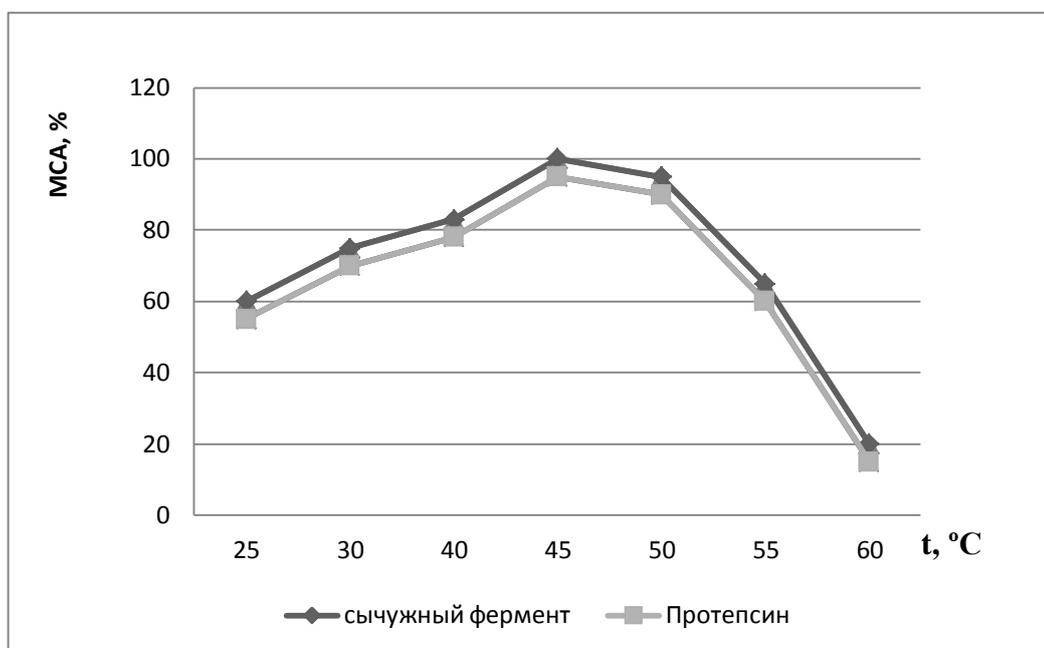


Рисунок 4.8 – Влияние температуры на МСА препаратов

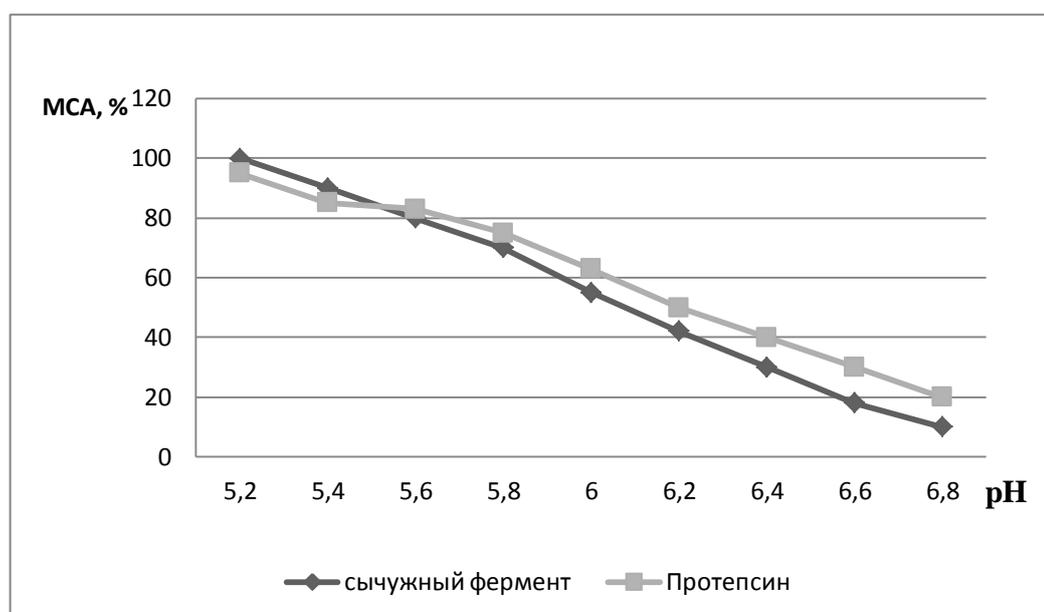


Рисунок 4.9 – Влияние рН на МСА препаратов:
сычужный фермент, «Протепсин»

Как видно на рисунках, препараты практически идентично реагируют на внешние факторы, что указывает на единую природу происхождения-животные организмы, условия нормального существования которых весьма близки, что поддерживается соответствующими ферментными системами. Препараты слабо проявляют коагулирующие свойства при рН, близких к нейтральному значению

и весьма усиливаются при снижении pH. Температурные оптимумы связаны с физиологическими условиями существования животных организмов и находятся в интервале 40-50°C.

Учитывая чрезвычайно важную роль Ca^{2+} в механизме коагуляции белков молока, представляло интерес провести исследование влияния этих катионов на активность ферментов. При этом пользовались известной информацией Горбатовой К.К. о том, что в процессе свертывания казеина молока различают 3 стадии: первая (ферментативная) связана с протеолитическим воздействием ферментов на молекулу казеина; вторая представляет физико-химический процесс структурообразования, которая связана с возникновением кальциевых мостиков между мицеллами казеина; третья связана с медленным протеолизом компонентов казеина под действием протеаз. От содержания Ca^{2+} в молоке зависит скорость его свертывания и качество сгустка. Завершающая стадия определяет качество сгустка, хранимость и потребительские свойства продуктов.

Изменение общей протеолитической активности при pH 6,5 и МСА в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} , вносимых в молоко в виде CaCl_2 представлено на рисунке 4.10.

Как видно на рисунке, при концентрации ионов Ca^{2+} 0,1 г/л МСА обоих препаратов увеличивалась практически одинаково. Концентрация Ca^{2+} 0,2 г/л молока снижала МСА, однако в случае сычужного фермента это снижение происходило более плавно, дальнейшее увеличение в среде ионов кальция к изменению МСА не приводило в обоих случаях.

Иная картина отмечена при исследовании влияния ионов кальция на ПА обоих препаратов. Активность с разной скоростью увеличивалась.

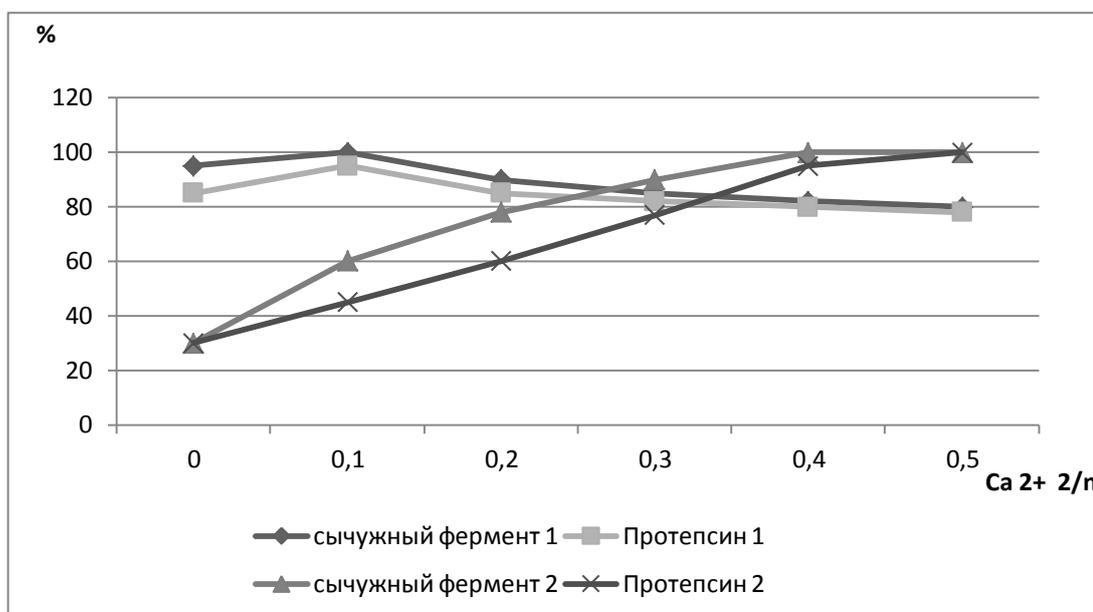


Рисунок 4.10 – Влияние Ca^{2+} на ПА и МСА ферментных препаратов

Несмотря на идентичность графиков следует отметить более высокую чувствительность препарата сычужного фермента к ионам Ca^{2+} как в случае ПА, так и МСА.

Рассматривая перспективу использования препарата «Протепсин» в качестве заменителя сычужного фермента в технологии сыров, весьма важна оценка соотношения ПА и МСА. При изучении этого вопроса ПА определяли в течение 3-х часов по методу Бенке (An_{180}). Величина An_{180} отражает гидролиз казеина в течение времени формирования сгустка и обработки сырного зерна. Учитывая, что в процессе созревания сыров в классических технологиях рН снижается в среднем до рН 5,5, необходимо учитывать глубину протеолиза и при этом рН. Для получения сравнимых результатов предварительно концентрации препаратов выравнивали по времени молокосвертывающей активности к 10 минутам свертывания и рассчитывали их активную массу. За единицу активной массы принимали количество препарата, которое вызывало свертывание 50 мл молока при рН 6,5 и 35°C в течение 10 минут. Экспериментальные результаты представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Сравнительная активная ферментных препаратов

Наименование препарата	Среднее время образования сгустка, мин.	МСА, ед/г	Коэффициент разведения	Конечное время свертывания молока, мин.	Активная масса, мг
Сычужный фермент	7,5	53180	1,3	10	7,69
«Протепсин»	5,5	39000	1,8	10	10,3

Как видно из данных таблицы 4.1, «Протепсин» в 1,3 раза активнее свертывает казеин молока. Для выяснения уровня протеолиза препаратов реакцию проводили при рН 6,5 и 5,5. Концентрации ферментных препаратов принимали исходя из активных масс в 100 мл раствора. Протеолиз вели при 35°C. Результаты приведены в таблице 4.2.

Таблице 4.2 – Сравнительная оценка A_{n180} ферментных препаратов

Наименование препаратов	A_{n180} , мг разлож. Белка	A_{n180} Протепсин
		A_{n180} Сычужный фермент
рН 6,5		
Сычужный фермент	$22,80 \cdot 10^{-4}$	3,7
Протепсин	$84,8 \cdot 10^{-4}$	
рН 5,5		
Сычужный фермент	$50,0 \cdot 10^{-4}$	4,1
Протепсин	$204,5 \cdot 10^{-4}$	

Как видно из данных таблицы 4.2, «Протепсин» в 3,7 раза активнее разлагает казеин при рН 6,5, а при рН 5,5-в 4,1 раза, чем сычужный фермент.

Таким образом, «Протепсин» активнее, чем сычужный фермент воздействовал на казеин молока, проявляя более глубокий протеолиз. Известно, однако, что более глубокий протеолиз не является главным недостатком заменителей сычужного фермента. Гораздо более важной информацией является специфичность действия ферментов, особенно в оценке продуктов гидролиза белков.

Для исследования общего количества пептидов и аминокислот использовали методику, разработанную сотрудниками ВНИИМС (глава II), когда после гидролитических превращений казеина определяли суммарное

количество оставшегося белка, образовавшихся пептидов и аминокислот. Результаты представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Характеристика продуктов гидролиза казеина под действием ферментных препаратов

Наименование препаратов	I акт. масса, г	25 акт. масс, г	Количество разлож. белка, г·%	Количество пептидов, г·%	Количество аминокислот, г·%
pH 6,5					
Сычужный фермент	0,00769	0,192	0,026	0,015	0,011
«Протепсин»	0,01030	0,257	0,075	0,048	0,053
pH 5,5					
Сычужный фермент	0,00769	0,192	0,058	0,024	0,034
«Протепсин»	0,01030	0,257	0,097	0,095	0,083

Как видно из результатов, по глубине гидролиза «Протепсин» почти в 3 раза превышает сычужный фермент при pH 6,5 и более, чем в 1,5 раза при pH 5,5 за 3 часа гидролиза. Оценка продуктов гидролиза за 24 часа показала, что с течением времени глубина гидролиза приближалась при действии препаратов, что может быть связано с гетерогенностью препарата «Протепсин» и механизмами кислотной инактивации фракций. Во всех случаях можно констатировать преобладание суммарных аминокислот за 24 часа гидролиза и суммарных пептидов за 3 часа гидролиза, что говорит о том, что ферменты препаратов обладают протеиназной и пептидазной активностями.

В оценке специфичности разрыва пептидных связей весьма важна оценка качественного набора аминокислот в гидролизатах субстрата. В опыте отбирали 10 мл гидролизатов казеина под действием ферментных препаратов после 24 часовой инкубации и осаждали в них белки 80%-ным этанолом. Осадок отделяли центрифугированием. Центрифугат оставляли в холодильнике на сутки. Дополнительно образовавшийся осадок отфильтровывали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат упаривали досуха на водяной бане. В остаток добавляли 5 мл дистиллированной воды и вносили 3,6 мл 60%-ной

салициловой кислоты. Смесь настаивали в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Затем вторично упаривали досуха. Полученный сухой остаток аминокислот хроматографировали на автоматическом аминокислотном анализаторе. Аналогичные действия проводили с контрольными образцами. Данные представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4– Аминокислотный состав гидролизатов казеина при действии ферментных препаратов

Аминокислоты	Количество аминокислот, мг·%			
	Сычужный фермент		Протепсин	
	рН		рН	
	6,5	5,5	6,5	5,5
Глютаминовая кислота	4,89	17,50	9,50	27,68
Глицин	1,98	2,75	2,22	13,00
Аланин	-	-	-	9,90
Цистин	-	-	-	-
Валин	0,76	3,74	26,80	58,76
Фенилаланин	4,26	12,42	14,96	68,38
Лейцин	-	-	-	6,20
Сумма	10,12	36,41	53,48	183,92

Как свидетельствуют полученные данные, «Протепсин» имеет, вероятно, более широкую субстратную специфичность, так как гидролизат казеина при действии ферментов препарата обогащен более широким набором аминокислот. Весьма важно, что в гидролизатах обоих препаратов преобладают фенилаланин, валин, глютаминовая кислота. Видимо, специфичность действия ферментов препаратов имеет общие черты.

Полученные данные свидетельствуют о реальной перспективе возможного использования препарата «Протепсин» в технологиях, где может быть предложен как заменитель сычужного фермента.

ГЛАВА V. ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА «ПРОТЕПСИН» В ТЕХНОЛОГИЯХ МЯСНЫХ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Как отмечалось в литературном обзоре, применение протеолитических ферментных препаратов имеет особое значение в переработке белоксодержащего сырья, куда относятся источники белков животного происхождения из-за их важности в питании и жизнедеятельности человека. Направление, связанное с трансформацией трудноперевариваемых белков в последнее время также получило бурное развитие из-за известного дефицита традиционных источников и значительной доли малоценных побочных продуктов и отходов перерабатывающих животное сырье производств. Однако ассортиментный перечень и технические решения пока ещё слабо внедряются в реальное производство, что требует дальнейших исследований возможностей применения ферментных препаратов в пищевых и кормовых системах, при получении пищевых и биологически активных добавок, биопрепаратов специального назначения.

Применительно к мясной промышленности можно выделить основные направления, представляющие перспективу технологий мясных продуктов и глубокой переработки имеющихся биоресурсов (рис.5.1).

На основе детализированного изучения биокаталитических свойств препаратов можно констатировать, что для молочной промышленности остается актуальной разработка молокосвертывающих ферментов при получении широкого спектра белковых препаратов, в том числе с использованием специальных заквасок, включающих бифидобактерии и другие полезные бактерии кишечника человека. На протяжении многих лет активно изучаются свойства молочной сыворотки как побочного продукта при производстве казеина, сыра, творога.

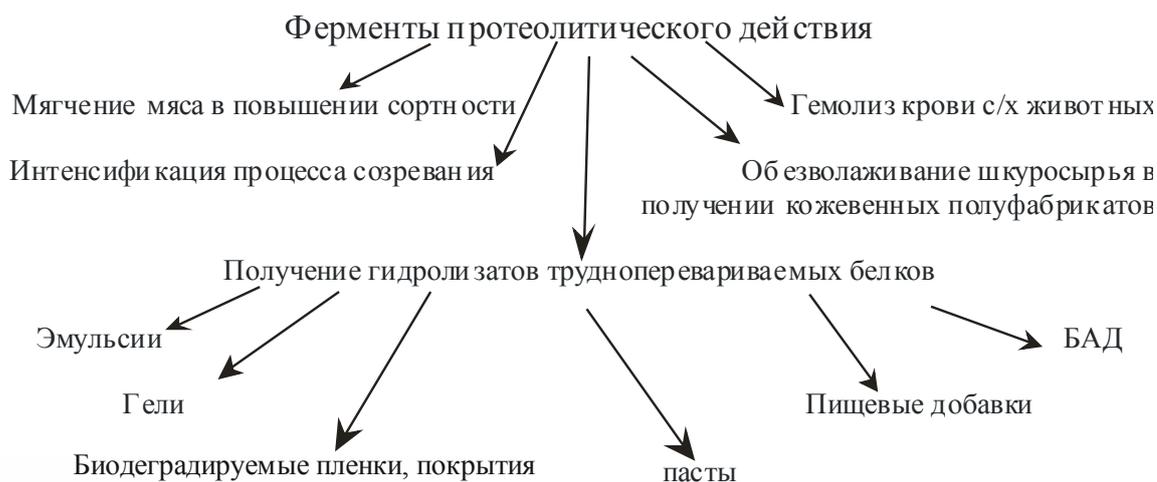


Рисунок 5.1 – Основные направления использования ферментов при обработке мясного сырья

Научная школа академика Храмцова А.Г. продолжает исследования в направлении идентификации продуктов ферментного преобразования белков сыворотки и их применения в технологии продуктов функционального назначения, а также для обогащения пищевых и кормовых рационов, при создании специальных ингредиентов, композитов, отдельных веществ для лечебно-профилактического и лечебного питания[153].

На основании результатов проведенных исследований комплекса свойств препарата «Протепсин» предлагаются пути расширения областей его применения, апробированные и внедренные в реальном производстве.

При разработке технических решений принимали информацию, полученную в результате выполненных собственных экспериментальных исследований и обобщений имеющейся информации.

5.1. Применение ферментного препарата «Протепсин» для обработки сырья мясного происхождения

5.1.1. Обобщенная характеристика препарата применительно к технологиям обработки мясного сырья

«Протепсин» – энзимный препарат животной природы, содержащий комплекс кислых протеиназ, предназначен для применения в мясной промышленности для обработки мясного сырья. Ферментный состав препарата сбалансирован по степени воздействия на различные белки мяса и мясных систем, применяющихся в технологии получения мясных продуктов.

«Протепсин» работает в мясной системе аналогично внутриклеточным ферментам (катепсинам). Он является их синергистом и обладает дополнительными качествами, которые позволяют ему воздействовать в более широком диапазоне технологических параметров, а также влиять на те белковые системы, на которые внутриклеточные ферменты не действуют или оказывают действие в незначительной степени.

Введение «Протепсина» в мясную систему повышает водосвязывающую способность и гидратацию белков за счет их взаимодействия с активными центрами энзимов. Это приводит к разрыхлению структуры белков, увеличению иммобилизованной влаги в мясе и степени пенетрации. При использовании «Протепсина» потери массы мясной системы при тепловой обработке уменьшаются.

При производстве мясопродуктов «Протепсин» применяли в реальных опытах в количестве 0,01÷0,02% к массе продукта.

Препарат проявляет свойства в мясных системах при условиях:

- рабочая активность препарата проявляется при температурах 20÷50°C,
- оптимальная температура работы фермента в мясных системах 45°C,

- полная инактивация ферментного комплекса протеаз происходит при 70°C в течение 15 минут,

- рекомендуемая норма внесения препарата рассчитана на состояние системы с рН 4,0÷6,0.

Ферментный препарат «Протепсин» вырабатывается по ТУ 9219-005-42789257 и имеет свидетельство о государственной регистрации № 77.99.11.9.У.9108.8.05, а также декларацию о соответствии таможенного Союза RU.AT66.X-RU.AT66.6.07179.

Для целенаправленного и эффективного применения препарата в мясных системах исходили из свойств и диапазонов активности исследуемых ферментов препарата. А также свойств белков мясной системы с учетом их количественного соотношения.

При использовании препарата следует учитывать свойства белков мяса как субстратов:

Миоген. Под миогеном подразумевается гетерогенная система белков, на долю которой приходится около 20% всех белков мышечного волокна. Он растворяется в воде, образуя растворы небольшой вязкости. Температура денатурации свободного от солей миогена 55-60°C, изоэлектрическая точка лежит в интервале рН 6,0-6,5.

Глобулин X составляет около 20% общего количества белковых веществ мышечного волокна. Растворим в солевых растворах, в том числе низкой концентрации, температура денатурации при рН 6,5 около 50°C, изоэлектрическая точка лежит в интервале рН 5,0-5,5.

Миозин. Обычно под миозином подразумевается вся миозиновая фракция. Миозин составляет около 40% белков мышечной ткани. Температура денатурации миозина около 45-50 °С (у птицы около 51°C), изоэлектрическая точка при рН 5,4.

Актин составляет 12-15% всех мышечных белков и является основным компонентом тонких нитей.

Актомиозин - комплекс актина и миозина, возникающий на первой стадии автолитических превращений.

Миоглобин - хромопротеид, составляющий в среднем 0,6-1,0 % общего количества белков. Миоглобин хорошо растворим в воде. Температура денатурации около 60°C. Миоглобин, присоединяя кислород, образует оксимиоглобин светло-красного цвета, который переходит с течением времени в метмиоглобин, что дольше сохраняет товарный вид продукта и не требует применения красителей или снижает дозу их использования.

Из сопоставления свойств белков с рабочим диапазоном «Протепсина» видно, что его применение в типовых режимах таких технологических операций как массажирование, тумблирование и тендеризация может дать значительный положительный эффект. Многократная практическая апробация в технологии мясных продуктов показала, что время этих операций сокращается в 3-5 раз. При подготовке говядины целесообразно проведение двухстадийной механической обработки, предусматривая на первой стадии тендеризацию с «Протепсином», и на второй стадии – тумблирование или массажирование в присутствии рассолов, состав которых не должен снижать эффективности суммарных ферментативных процессов уже на первой стадии механической обработки, а суммарный эффект от воздействия «Протепсина» на строматические белки может быть весьма высок из-за уникальных свойств.

Коллаген- фибриллярный белок, имеет упрочнённую структуру и нерастворим в обычных растворителях. При смещении pH в кислую сторону от изоэлектрической точки, коллаген способен сильно набухать в водных растворах, увеличивая свою массу в 1,5-2,0 раза, а в состоянии полного набухания может достигать до 1000% по массе .

«Протепсин», обладая коллагеназной активностью, высвобождает из него пролин и нестандартные аминокислоты: гидроксипролин (оксипролин) и гидроксизин, что обеспечивает пищевую ценность коллагена в рационе полноценного питания, о чём говорилось выше.

Эластин и ретикулин обладают свойствами, подобными коллагену. Эластин богат глицином, аланином, валином и пролином, суммарное содержание которых в эластине составляет почти 70%. В обычном виде эластин и ретикулин практически не расщепляются пищеварительными ферментами и плохо усваиваются организмом.

Обобщенная информация о влиянии различных аддитивов позволяет сформулировать рекомендации по применению ферментного препарата «Протепсин» в составе рассолов с учетом влияния имеющихся в составе компонентов, а также применения их в составе мясных систем.

Соль поваренная пищевая. Концентрация поваренной соли в мясной системе от 1,4 до 3,0% является наиболее приемлемой для действия «Протепсина» и совпадает с наилучшей органолептической оценкой мясопродуктов. При концентрации соли 2-3% активность «Протепсина» остаётся такой же, как в несоленом мясе. Введение поваренной соли в мясо способствует сдвигу температуры начала коагуляционных процессов при термообработке в высокотемпературную область и тем самым увеличивает время воздействия «Протепсина». Если начальное значение рН мяса больше изоэлектрической точки его белковой системы (рН= 5,3-5,5), то введение поваренной соли приводит к снижению рН и возрастанию влагосвязывающей способности мясных белков под действием «Протепсина». Введение поваренной соли активизирует окислительные процессы в мясе и способствует проявлению антимикробных эффектов. В том случае, когда по технологии требуется концентрация соли >6%, она оказывает ингибирующее действие на «Протепсин».

Сахара. Введение сахаров (сахарозы) улучшает вкус мясопродуктов (смягчая солоноватость), повышает стабильность окраски, поддерживает жизнедеятельность молочнокислой микрофлоры. Заметное улучшение вкуса соленых изделий отмечается при введении 1,5-2,5 % сахара к массе сырья. Сахара положительно влияют на действие «Протепсина».

Нитрит натрия используют в виде растворов (с концентрацией не выше 2,5%); в шприцовочных рассолах концентрация нитрита составляет, как правило, от 0,02 до 0,1%. Роль нитрита натрия многофункциональна: кроме его участия в процессе образования нитрозопигментов, он существенно влияет на формирование вкусо-ароматических характеристик, оказывает антиокислительное действие на липиды и выраженное ингибирующее действие на рост микроорганизмов, токсигенных плесеней и образование ими токсинов. Оказывает слабое угнетающее действие на активность «Протепсина».

Фосфаты. Введение фосфатов приводит к набуханию миофибрилл, стабилизирует цветообразование, поэтому требует меньшее количество нитрита для получения необходимого цвета мясopодуKтов, а за счет коагуляции экстрагированных солерастворимых белков при термообработке продукт приобретает монолитную структуру.

По литературным данным, при введении более 0,5% фосфатов к массе сырья, появляется терпкий металлический привкус продукта. Кроме того, снижается кальциевая адсорбция в организме, что приводит к развитию костных заболеваний. Поэтому рекомендовано вводить при посоле сырья не более 0,3-0,5% фосфатов в пересчете на безводный препарат.

Наличие фосфатов в мясных системах значительно замедляет действие «Протепсина». Введение фосфатов в систему рекомендуется проводить после завершения ферментативных процессов.

Хлористый кальций применяют в виде водных растворов с концентрацией от 1,5 до 25,0%, либо в составе шприцовочных рассолов в соответствии с нормативно-технической документацией на продукт. Оказывает бактериостатическое действие, улучшает выраженность цвета, интенсифицирует процессы реструктурирования кальцийзависимых белков. Существенно активизирует деятельность «Протепсина», усиливая его влияние на время созревания мяса.

Глутаминовая кислота и её соль- глутаминат натрия являются основными усилителями аромата и вкуса мясных изделий. Они имеют

кристаллическую структуру, растворяются в воде, улучшают естественный вкус и запах готовых изделий, вырабатываемых из размороженного мяса, мяса хряков, смягчают солоноватый и горький привкус. Степень выраженности вкусо-ароматических свойств, при внесении глутаминовой кислоты и глутамината натрия зависит от рН мяса. Для мясопродуктов с величиной рН, близкой к 6, рекомендуется добавлять один глутаминат в шприцовочные рассолы (0,5-1,2%). Верхний предел эффективного действия «Протепсина» соответствует кислотности системы при рН=6,0.

Уксусная кислота применяется в качестве компонента маринадов и как консервант. Оказывает слабое положительное действие на активность «Протепсина».

Молочная кислота - одноосновная оксикарбоновая кислота, используется в виде раствора, либо натриевой соли с нейтральным рН с целью стабилизации свойств готовой продукции при хранении, подавления развития патогенных микроорганизмов, регулирования уровня водосвязывающей способности сырья, интенсификации процесса цветообразования. Оказывает положительное действие на активность «Протепсина».

Лимонную кислоту или лимоннокислый натрий применяют при изготовлении мясопродуктов с длительным сроком хранения. Помимо консервирующего действия, лимонная кислота, сдвигает рН в кислую сторону, что снижает количество остаточного нитрита натрия; улучшает цвет, консистенцию, сочность; повышается стабильность продуктов при хранении. Лимонная кислота активизирует деятельность тканевых ферментов и существенно повышает эффективность применения «Протепсина».

Аскорбиновую кислоту и аскорбинат натрия применяют для ускорения реакции образования окраски, улучшения внешнего вида и устойчивости цвета при хранении мясопродуктов. Оптимальное количество кислоты 0,02-0,05%, производных солей 0,03-0,07%. Аскорбиновая кислота снижает остаточное содержание нитритов в готовом продукте примерно на 30%, ингибирует

образование нитрозаминов, усиливает антибактериологические свойства нитрита. На действие «Протепсина» практического влияния не оказывает.

Горчица активизирует деятельность «Протепсина», повышает растворимость белков, обладает бактериостатическим действием.

Спиртовые настои трав (мяты, энзифоры и др.) повышают растворимость мышечных белков, повышают водосвязывающую способность, улучшают вкусо-ароматические свойства, повышают срок хранения готового продукта. Эти и аналогичные добавки лечебно-профилактического и реабилитационного назначения на функциональных свойствах «Протепсина» не отражаются.

Бактериальные закваски. Для изготовления мясопродуктов с длительным сроком хранения применяют молочно-кислую закваску. Она пагубно действует на развитие гнилостных микроорганизмов, ускоряет процессы созревания сырья и формирования специфического вкуса и аромата готового продукта.

Молочные белки (молочная сыворотка, концентрат сывороточных белков, казеинат натрия) обладают высокими функциональными свойствами. Благоприятным фактором использования молочных белков является их высокая растворимость, как в составе шприцовочных рассолов, так и при введении в массажер при обработке сырья. Эффект при использовании молочных белков – это увеличение нежности, стойкости при хранении, улучшение цвета, запаха, вкуса.

Для изготовления мясных продуктов часто используют белковый молочный препарат следующего состава: молочный белок (казеинаты и сывороточные белки) – 45%, лактоза – 28%, зола – 15%, влага – 4%, молочный жир – 4%. Этот молочный препарат увеличивает водосвязывающую способность, выход, консистенцию, оказывает положительное действие на вкус и аромат. Его также применяют при пониженном содержании в продукте поваренной соли и фосфатов. Применение бактериальных заквасок и стартовых культур одновременно с «Протепсином» значительно повышает эффект действия на мясную систему.

5.1.2. Применение препарата «Протепсин» для интенсификации процессов созревания мяса

При введении в мясное сырье раствора «Протепсина» протекают процессы, сходные с изменениями, наблюдаемыми при естественном созревании мяса под действием собственных внутриклеточных ферментов (катепсинов).

При производстве мясопродуктов невозможно создать условия, оптимальные для действия собственных ферментов мяса, поэтому обработка «Протепсином» позволяет снизить жесткость мяса, существенно (в 2-3 раза) сократить продолжительность технологического процесса, снизить его трудоемкость и энергоемкость. Кроме этого, обработка «Протепсином» обеспечивает деструктивные изменения, приводящие к повышению скорости распределения посолочных веществ, позволяет улучшить структурообразующую способность фарша, консистенцию готового продукта, повысить содержание усвояемых белков. Обработка ферментом способствует повышению пищевой и биологической ценности мясопродуктов.

Применение «Протепсина» целесообразно для производств, испытывающих потребность в быстром и эффективном использовании сырья и в сокращении энергетических и временных затрат на хранение и переработку мяса.

В зависимости от глубины ферментативной обработки достигаемый результат подразделяют на три уровня:

-частичный протеолиз - белковые молекулы частично разрушаются, содержание свободных аминокислот в мясе возрастает, при этом микроскопическая структура мяса полностью сохраняется, а влагосвязывающая способность увеличивается- мясо имеет обычный товарный вид, но становится мягче;

- протеолиз средней степени - расщепление белковых молекул, появление большого количества свободных аминокислот, при этом мясо ещё не теряет своей обычной структуры, но разминается между пальцами, влагосвязывающая способность снижается;

-глубокий протеолиз - количество свободных аминокислот достигает 20-30% и более к общему содержанию белка, мясо полностью теряет свою структуру, превращаясь в кашицеобразную массу, мясо теряет свои функционально-технологические свойства.

Наилучший технологический результат при работе с «Протепсином» достигается при условии протекания частичного протеолиза.

Для контроля глубины протекания протеолиза при отработке технологических режимов производства мясопродуктов из ферментативно обработанного сырья рекомендуется проводить контрольное определение небелкового азота (суммы азота полипептидов, аминокислот и других азотистых органических соединений) с использованием любого доступного метода.

С целью ускорения процессов послеубойного созревания мяса, например, говядины и мяса других животных целесообразно обрабатывать раствором «Протепсина». Обработка «Протепсином» парного (или охлажденного) мяса позволяет сократить продолжительность созревания до 2-х суток (вместо 5-8 для говядины). При этом количество свободных аминокислот увеличивается в 2-3,5 раза по сравнению с естественным созреванием.

На разделку и обвалу поступает мясное сырье на кости в парном или охлажденном несозревшем состоянии. Температура мясного сырья должна быть:

-парного - не ниже 35°C;

-охлажденного - от 0 до 4°C.

При использовании парного мяса важно, чтобы соблюдалась ритмичная подача, выявление и обработка мясного сырья. Общая продолжительность технологического процесса от убоя до шприцевания не должна превышать 1,5 ч.

Из парного мясного сырья на кости выделяют бескостные отрубы, которые немедленно направляют на шприцевание.

Рецептура рассола приведена в таблице 5.1

Таблица 5.1 – Условия посола охлажденного мясного сырья с использованием ферментного препарата «Протепсин»

Метод посола	Степень измельчения, мм	Продолжительность выдержки, ч
Концентрированным раствором поваренной соли	2-6	6-12
Сухой поваренной солью	2-6	8-16
	8-12	12-24

В случае, если мясное сырье предназначено для использования при производстве продуктов из мяса (копченостей) или ветчинных изделий, 1%-ый раствор «Протепсина» (из расчета 1,0-2,0л на 100кг сырья или 0,01% -0,02% к массе сырья) добавляют в рассолы, используемые на предприятии, уменьшая на соответствующее количество долю воды в рецептуре рассола.

Продолжительность массирования мясного сырья с «Протепсином» сокращают на 20-50% в зависимости от вида мясного сырья.

Препарат «Протепсин» возможно применять в случае использования мяса, длительно хранившегося в замороженном состоянии, так как возникающие при этом денатурационные процессы значительно снижают функционально-технологические свойства. Препарат нивелирует этот недостаток, при этом возможно применение способа посола, указанного для охлажденного мяса. Подготовленное сырье шприцуют в количестве 10% к массе и подвергают созреванию в течение 2-х суток, в том числе в упакованном виде.

Вовсех случаях применения препарата «Протепсин» ускоряет процессы гидролитического распада и дезинтеграции белковых структур мяса с образованием пептидов и аминокислот, что и является причиной размягчения мясных тканей. При этом препарат наиболее часто и эффективно гидролизует пептидные связи, образованные фенилаланином, лейцином и тирозином. Реже - глутаминовой и аспарагиновой кислотами, аланином, метионином, валином,

лизином, серином, гистидином. Пептидные связи, в которых участвуют глицин, изолейцин, пролин, аргинин, цистеин им почти не гидролизуются.

«Протепсин» вызывает определенные четкие изменения в структуре коллагена. Основная часть молекулы коллагена полностью устойчива к «Протепсину». В начале препарат действует на сопутствующие вещества, а затем на концевую область молекулы коллагена. Более длительное воздействие способно вызывать дезагрегацию фибриллярных структур и разрушение внутримолекулярных поперечных связей, способствует отщеплению концевых участков молекул коллагена, не участвующих в трехцепочных спиральных (при этом спиральная структура коллагена сохраняется).

Препарат действует на межмолекулярные связи коллагена. При этом происходит распад коллагена до мономерных молекул тропоколлагена, в результате чего нерастворимый коллаген частично переходит в растворимое состояние. Это свойство препарата позволило апробировать его для обработки низкосортного мясного сырья, субпродуктов и свиной шкурки.

«Протепсин» используют для подготовки низкосортного мясного сырья (говядины жилованной 2-го сорта, возможно конины 1 и 2 сортов, баранины, мяса диких животных, говяжьих голов, сердца говяжьего и свиного, пашины говяжьей, диафрагмы, свиной шкурки, рубца говяжьего, желудков свинных, срезок от разделки и обрядки сырья для полуфабрикатов и копченостей, мяса кур-несушек и др.) при производстве вареных колбасных изделий. полукопченых колбас, паштетов, ветчинных изделий, продуктов из мяса, консервов и пр.

Подготовленное мясное сырье измельчают в волчке через решетку 3-5мм (для изготовления ветчинных изделий-5-25 мм). Затем измельченное сырье переносят в мешалку, добавляют поваренную соль из расчета 2,0-2,5 кг на 100 кг сырья и 1 л раствора «Протепсина». Допускается поваренную соль вносить в виде концентрированного 26%-го раствора или добавлять в мешалку до бл воды на 100 кг сырья. Добавленная при посоле вода учитывается при составлении рецептуры.

Мясное сырье перемешивают в мешалке в течение 3-5 минут до равномерного распределения поваренной соли по массе сырья. Затем сырье выгружают и выдерживают в течение 12-24 часов при температуре 2-6°C.

Не рекомендуется при посоле мясного сырья с «Протепсином» добавлять нитрит натрия.

Подготовленное приведенным способом сырье используют при производстве вареных колбасных изделий, полукопченых колбас, паштетов, ветчинных изделий, продуктов из мяса, консервов и пр. согласно рецептурам на конкретные наименования изделий.

При переработке свиной шкурки без предварительного измельчения «Протепсина» рекомендуется вносить в рассол для замачивания шкурки в виде раствора из расчета 2,0л 1%-го «Протепсина» на 100л рассола. Наилучший технологический эффект достигался при использовании кислых рассолов, приготовленных с добавлением кислых фосфатов, пищевых кислот и т.п. в соответствии с рекомендациями фирм, поставляющих данный вид ингредиентов. При посоле сердца, свиной шкурки, говяжьего рубца и свиных желудков и другого сырья с высоким содержанием соединительной ткани для достижения более быстрого технологического эффекта доза внесения «Протепсина» может быть увеличена до 2л на 100 кг сырья (0,02% препарата к массе сырья).

Примеры реализованных технологий обработки свиной шкурки при получении эмульсий приведены ниже.

Рецептура: шкурка свиная-100кг; лед-128кг; протепсин-2 литра; соль-4,6кг; фосфат-0,3кг.

Раствор «Протепсина» готовили из расчета 10 г препарата на 1л воды.

1 вариант.

1.20г протепсина в 2 литрах воды температурой 36-37°C и настаивают в течение 30 минут.

2. Шкурку свиную:мороженную предварительно измельчают на блокорезке,охлажденную предварительно измельчают на волчке (допускается

не измельчать при условии функциональных возможностей куттера) загружают в куттер, заливают раствор «Протепсина», соль, фосфат и куттеруют шкурку до размера кусочков 3 мм.

3. Измельченную шкурку выгружают из куттера и оставляют на созревание на 12-24 часов при температуре 0-4°C.

4. После созревания шкурку куттеруют в несколько этапов.

1 этап - до 35°C, 2 этап - до 20°C, 3 этап - до 10-15°C.

II вариант (без созревания).

Шкурку загружают в куттер. Заливают раствор «Протепсина» (если шкурка мороженая «Протепсин» заливают при плюсовой температуре), закладывают соль, фосфат и куттеруют до температуры 35°C, засыпают оставшийся лед и ведут обработку до температуры 12°C.

5.1.3. Применение ферментного препарата «Протепсин» для предварительного посола мороженого блочного мяса

В настоящее время показано, что ферментный препарат Протепсин может с эффектом использоваться при размораживании блочного мяса, т.е. проводить посол без предварительного размораживания. В ходе экспериментальных исследований рекомендована рецептура состава: говядина II сорта (голяшка)-100кг, вода-24 кг, протепсин-1 литр (0,01%). Измельченное мясо загружали в куттер и продолжали измельчение до размеров 3 мм. Добавляли в процессе измельчения воду для отепления мяса, а затем раствор «Протепсина», соль до дисперсности 1-2 мм, подвергают созреванию в течение 12-24 часов. Отработаны условия применения ферментного препарата при составлении фарша на первой стадии куттерования и вносят на второй стадии компоненты по рецептуре.

Рецептура:

Говядина 2 сорта (ПЧБ, голяшка)-100кг

Вода -24кг

«Протепсин»

-1 литр

Итого	125 кг
Соль	-2,5 кг

Порядок приготовления:

1. 10 г «Протепсина» разводят в 1 литре воды 36-37°C и настаивают в течение 30 минут.
2. Измельченное через блокорезку мясо загружают в куттер и продолжают измельчать до размера кусочков 3мм.
3. Продолжая измельчение, добавляют воду (для отепления мяса), а затем раствор «Протепсина», затем соль и куттеруют до размера кусочков 1-2мм.
4. Выгружают из куттера. Раскладывают в ванны-тележки и ставят на созревание на 12-24 часа.
5. Применяют в рецептурах вареных колбас, сосисок, сарделек взамен говядины высшего, первого, второго сорта.
6. 20% влаги корректируют, 5% влаги оставляют.

5.1.4. Применение препарата «Протепсин» для улучшения свойств субпродуктов

Среди побочных продуктов, богатых соединительнотканными белками, значительная доля приходится на субпродукты. По пищевой ценности они подразделяются на субпродукты I и II категории, их выход соответственно составляет 3 и 7% к массе скота. В зависимости от категории они сильно различаются массовой долей коллагена. Субпродукты I категории по пищевой ценности эквивалентны мясу, поэтому успешно используются при выработке высокосортных колбас, консервов, реализуются непосредственно через торговую сеть и пользуются большим спросом у населения, из них получают деликатесные продукты.

В то же время субпродукты II категории, богатые коллагеном, имеют ограниченное применение. Их используют при получении зельцев, субпродуктовых, ливерных, полукопченых колбас и консервов. Субпродукты II категории приближаются по свойствам к соединительным тканям. В их химическом составе белки составляют от 10,5 до 25,2%, жиры от 2,3 до 14,1%, вода от 60,9 до 85,0%.

Субпродукты II категории по биологической ценности приближаются к жилованному мясу первого сорта. По содержанию незаменимых аминокислот наиболее близка к мясу селезенка говяжья (1,4 % триптофана, 9,4% лизина, до 7,4% изолейцина и 3,2% метионин+цистин). Богатыми источниками незаменимых аминокислот являются рубец, легкие и почки говяжьи. Субпродукты II категории содержат большую массовую долю солерастворимого белка, известного своей функциональностью в образовании структуры мясных систем и перспективного для разработки мясных эмульсий.

После обработки «Протепсином» субпродуктов II категории их соединительнотканнные белки набухают, что придает субпродуктам новые

свойства, позволяющие найти им более широкое применение в деликатесной продукции и колбасном производстве.

В результате предварительной подготовки мясного сырья улучшаются его функционально-технологические свойства и стабилизируется качество имеющихся ресурсов, позволяющее значительно расширить сырьевую базу отрасли и область его возможного применения.

5.1.5. Частные технологии мясопродуктов с применением препарата «Протепсин»

Результаты экспериментальных исследований позволили разработать совместно с ВНИИМПом и ЗАО «Завод эндокринных ферментов» техническую документацию по применению ферментного препарата «Протепсин» в частных технологиях мясных продуктов (см. Приложение). Разработки отмечены дипломами, внедрены на ряде мясоперерабатывающих предприятий со значительным экономическим эффектом. Пример рецептуры мясопродуктов с применением препарата «Протепсин» представлен в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Пример рецептуры колбасы типа «Докторская»

Наименование сырья	Базовая рецептура №1	Новая рецептура
Говядина в/с	25кг	25+6,25=31,25 кг
Свинина полужирная	70 кг	70 кг
Молоко сухое	2 кг	2кг
Яйца куриные	2 кг	3 кг
Пряности и материалы		
Соль	2,09 кг	10,40 кг
Нитрит натрия	7,5 кг	7,5кг
Смесь Докторская	1,0 кг	1,0 кг
Каррагенан	0,3 кг	0,3 кг
Вода, лед	28кг	28-5=23 кг
Всего:	131,3 кг	131,5 кг

В результате созревания мяса с применением ферментного препарата «Протепсин» повышаются функциональные свойства мяса, размягчается

соединительная ткань, раскрывается мясной вкус, исключаются потери при размораживании сырья, за счет использования низкосортного сырья значительно увеличивается рентабельность производства.

1. Применение препарата в технологии деликатесных мясных продуктов с применением препарата «Протепсин» и формированных в свиную шкуру. Как отмечалось выше, воздействие ферментного препарата «Протепсин» обеспечивает конформационные изменения соединительно-тканых белков. При ферментативном воздействии на коллаген соединительной ткани, из которой преимущественно и состоит свиная шкура, происходит разрушение дисульфидных и водородных связей тройной спирали макромолекулы коллагена, что способствует существенному размягчению свиной шкурки и значительному понижению гидротермической устойчивости коллагена, предопределяющему повышение его перевариваемости протеиназами желудочно-кишечного тракта после термообработки сформированного продукта. Кроме того, вызванные действием протепсина изменения коллагена соединительной ткани свиной шкурки, обеспечивают при относительно низкой (71-73°C) для термогидролиза коллагена температуре термообработки деликатесного продукта, его монолитность по всему объему.

Использование заквасочных бактериальных культур обеспечивает проведение посола при температуре 12-19°C, кроме того, они способствуют интенсификации образования окраски и её стабилизации, снижению количества остаточного нитрита натрия, повышают потребительские характеристики и гигиеническую безопасность продукта.

Частичный протеолиз под действием ферментного препарата и ферментных систем микроорганизмов улучшает функциональные свойства белков, увеличивает влагосвязывающую способность сырья и повышает выход готовой продукции. В итоге процесс ферментирования улучшает органолептические и физиологические показатели качества готового деликатесного продукта.

Далее в примерах расход «Протепсина» указан в пересчете на сухой порошок. Вносят же «Протепсин» в мясную систему в виде раствора.

Использование «Протепсина» в технологии приготовления указанных ниже продуктов позволяет сократить сроки их приготовления в несколько раз. В частности время посола сокращается с 10-15 суток до 2-3 суток.

2. Рулет из говядины.

Исходное мясное сырьё:

-говядина жилованная II сорта.

Для производства деликатесного продукта из ферментированного мяса берут 70 кг говядины, измельчают через приемную решетку волчка на куски массой 100г, помещают в мешалку, и в процессе перемешивания вносят поваренную соль 1,75кг, ферментный препарат «Протепсин» 7-10г (0,01% к массе сырья), нитрит натрия (в растворе) 7г, воду 7л. После чего осуществляют посол мясного сырья при температуре 0°С в течение 72ч.

К 30 кг свиной шкурки добавляют воду в количестве 15л, поваренную соль 0,9кг, ферментный препарат «Протепсин» 4-4,5г (0,013-0,015%) и выдерживают в посоле при температуре 0°С в течение 72ч. После окончания посола в ферментированную говядину при перемешивании вносят специи: сахарный песок 500г, перец черный молотый 150 г, лавровый лист 7, чеснок свежий очищенный 300г и проводят формирование в предварительно ферментированную свиную шкурку таким образом, чтобы её жиросодержащий слой оказывался на внешней стороне сформированного батона, после чего оборачивают в целлофан, перевязывают шпагатом, проводят осадку и тепловую обработку по следующему режиму: в предварительно прогретой до температуры 110°С камере нащпринцованные батоны выдерживают в течение 1ч, затем температуру снижают до 80°С и варят их в течение 3,5 ч до достижения внутри продуктатемпературы 71°С, после чего батоны подсушивают, а затем коптят в течение 1,5 ч при температуре 45°С и охлаждают до температуры 8 °С.

Исходное мясное сырьё:

-говядина односортной жиловки.

Для говядины односортной жиловки выдержку в посоле сокращают до 48 часов (из-за меньшего содержания соединительной ткани по сравнению с говядиной II сорта). Количество «Протепсина» для ферментации свиной шкурки берут в 1,5-1,6 раза больше (примерно 0,02г на 1кг шкурки), чтобы устранить различия в плотности шкурки и мышечной ткани, а время ферментации шкурки сокращают до 48 часов.

В случае использования заквасочных культур рекомендуется применять смесь молочнокислотных *Laktobakteriumplantarum* (шт.31 и 32) и денитрифицирующего *Micrococcuscasioliticus* (шт. 38) в соотношении 2:2:1 в концентрации 90 млн. клеток на 1 г сырья. В этом случае посол мясного сырья и свиной шкурки осуществляют при температуре 15-19°C в течение 42-36 ч соответственно.

При апробации в технологиях с использованием различных видов мясного сырья показано, что каких-либо особенностей в зависимости от вида не отмечается. Аналогично получены рулеты из конины и баранины. Ассортимент при значительном варьировании сырьевых ресурсов может быть практически не ограниченным. Качество готовых продуктов были на уровне или выше контрольных образцов, что отмечалось дегустаторами.

5.2. Способ производства мясных продуктов с применением ферментной обработки сырья и плазмы крови убойных животных

Цельномышечные продукты в последнее время пользуются все большим потребительским спросом и по объему производства составляют четверть всего объема продукции, вырабатываемого предприятиями мясной отрасли практически во всем мире.

При производстве копчено-запеченых продуктов из говядины, например, филея копчено-запеченого, для улучшения вкусовых свойств готового продукта посол сырья осуществляют в два этапа: шприцевание мясного сырья

посолочным рассолом с двух сторон и выдержка в посолочном рассоле с добавлением маринада в течение 3-5 суток.

Недостатком выше описанного способа производства копчено-запеченых продуктов из говядины является большая продолжительность во времени процесса получения готовой продукции, а также сравнительно не высокий процент выхода продукта от массы несоленого сырья.

Известен продукт говяжий копчено-запеченый и способ его производства, предусматривающий подготовку мясного сырья путем выделения мышц из говяжьих полутуш, приготовление посолочного рассола с использованием соли поваренной пищевой, нитрита натрия, сахара-песка и аскорбиновой кислоты, шприцевание мясного сырья посолочным рассолом с последующим массированием циклами механического воздействия и отстоя, выдержку на созревании при температуре от 0 до 4 °С, формирование с укладкой в сетки, термическую обработку, включающую подсушку, копчение, варку, охлаждение, в соответствии с известной информацией.

Известны копчено-вареный окорок, шейка, карбонад, корейка, грудинка и способ их производства, включающий подготовку мясного сырья, приготовление посолочного рассола, посол мясного сырья, формирование, подсушку, копчение и варку.

Однако, известные способы являются недостаточно эффективными, так как не обеспечивают равномерности распределения рассола в мясном сырье, что отрицательно сказывается на качестве изготавливаемого продукта, а также предусматривают длительную термообработку.

Новый способ связан с повышением качества и биологической ценности изготавливаемых мясных продуктов путем улучшения их органолептических свойств при одновременном повышении эффективности процесса посола и сокращении времени посола, а также повышения качества и выхода изготавливаемого продукта.

Поставленная техническая задача решается за счет того, что способ производства деликатесной копчено-запеченой продукции предусматривает

подготовку мясного сырья путем выделения из говяжих и (или) свиных полутуш кусков мясного сырья, последующее соление мясного сырья мокрым методом с использованием шприцевания в мышечную ткань рассола, укладку нашприцованных кусков в емкость и выдержку в посолочной камере при температуре 0-4°C в течение 2-3 часов с последующей термообработкой в режиме копчения-запекания при температуре 85-95°C в течение 6-7 часов, охлаждение готовой продукции до достижения температуры в толще не выше 0-8°C, при чем предварительно готовят рассол для шприцевания, в состав которого вводят раствор «Протепсина» стандартной протеолитической активностью 100 ед./г, при этом шприцовочный рассол готовят при следующем соотношении компонентов, на 100 кг:

вода	44,2 л
плазма крови убойных животных	44,2 л
соль поваренная пищевая	1,6 кг
раствор протепсина	10 л

Приготовленным рассолом шприцуют мясное сырье в количестве не более 10% от его массы с последующим выдерживанием в посолочной камере при температуре 0-4°C в течение 2-3 часов, контроль качества готовой продукции осуществляют после охлаждения, после чего готовый продукт упаковывают и укладывают в тару.

Технический результат состоит в улучшении структурно-механических и функционально-технологических свойств мясного сырья и тем самым в повышении качества и биологической ценности готового продукта при одновременном повышении выхода, экономичности и технологичности производственного процесса и сокращении времени посола сырья.

Введение в мясную систему ферментного препарата «Протепсин» повышает водосвязывающую способность и гидратацию белков за счет частичного гидролиза белков, включая соединительно-тканые, что приводит к росту функциональных групп и разрыхлению структуры белков, увеличению иммобилизованной влаги в мясе и степени пенетрации. Кроме того,

использование «Протепсина» способствует значительному сокращению времени выдержки сырья в посоле и уменьшению потери массы мясной системы при тепловой обработке за счет синергичности собственным ферментам мышечной ткани.

Дополнительное введение в состав рассола плазмы крови убойных животных повышает биологическую ценность из-за увеличения доли усвояемых белковых веществ, незаменимых аминокислот, улучшения структуры готового продукта.

Другим подходом к решению технической задачи является известный способ приготовления фарша из мороженых мясных блоков, предусматривающий отепление блоков мяса, измельчение и посол. Недостатками этого способа являются длительность процесса (24-48 часов) и значительные потери массы продукта.

Также известен способ приготовления фарша из мороженых мясных блоков, предусматривающий отепление блоков мяса, измельчение и посол, причем отепление блоков осуществляется в две стадии, а измельчение проводят между этими стадиями.

Недостатками данного способа являются длительность процесса приготовления фарша, так как используется отепление мясных блоков, потери массы при размораживании, увеличение энергозатрат в связи с использованием СВЧ-энергии при отеплении мясных блоков и низкие функционально-технологические свойства мясного фарша.

Технической задачей изобретения является сокращение длительности процесса, уменьшение потерь массы и придание фаршу улучшенных реологических и функционально-технологических свойств, повышение биологической ценности готовых изделий.

Решение технической задачи достигается тем, что в способе приготовления фарша из мороженых мясных блоков, предусматривающим измельчение мясных блоков и посол, измельчение мясных блоков осуществляют без предварительного отепления, а посол проводят с

добавлением ферментного препарата «Протепсин» стандартной протеолитической активностью 100 ед./г при следующем соотношении компонентов:

говядина II сорт (ПЧБ, голяшка)	100 кг
вода	12 кг
плазма крови	12 кг
раствор протепсина	1 л
соль	2,5 кг
итога	127,5 кг

Способ приготовления фарша из мороженых мясных блоков осуществляют следующим образом.

Готовят раствор «Протепсина» стандартной протеолитической активностью 100 ед./г: 10 г протепсина разводят в 1 л воды температурой 36-37°C и настаивают в течение 30 минут.

Измельченное через блокорежку мясо загружают в куттер и продолжают измельчать до размера кусочков 3 мм. Затем, продолжая измельчение, добавляют воду (для отепления мяса) и плазму крови, затем раствор «Протепсина», соль и куттеруют до размера кусочков 1-2 мм. Фарш выгружают из куттера, раскладывают в ванны-тележки и ставят на созревание на 12-24 часа.

Способ позволяет сократить время приготовления фарша, устранить потери при размораживании, повысить рентабельность продукции и улучшить функциональные свойства мяса (увеличивается влагоудерживающая способность мышечного белка, размягчается соединительная ткань, развивается мясной вкус).

Новые технические решения позволяют рационально и максимально использовать побочные продукты переработки животных, повысить выход и качество продуктов, в целом гарантировать высокий уровень потребительских свойств.

5.3. Исследование возможности использования препарата «Протепсин» в технологии приготовления сыров

В лабораторных условиях были проведены выработки сыра типа голландского круглого с использованием препарата «Протепсин». Контролем служил сычужный фермент. Выработку вели с полной заменой сычужного фермента и в соотношении 1:1 в смеси препаратов, в соответствии с действующей технической документацией.

Как показали экспериментальные варки сыров, процесс образования сгустка и его синергические свойства при действии препарата «Протепсин» практически не отличались от контроля. В отдельных случаях сырное зерно было несколько мельче. Дегустация сыров была проведена через 40 дней после выработки. Результаты органолептической оценки представлены в таблице 5.3.

Лабораторные выработки показали, что ферментный препарат «Протепсин» проявляет весьма близкие свойства к сычужному ферменту при его использовании в технологии твердых сыров. Имеющиеся недостатки, на наш взгляд, связаны с гетерогенностью протеолитического комплекса. При разработке эффективных недорогих технологий инактивации общепротеолитической фракции (протеиназа I) препарат может быть использован в широком ассортиментном перечне белковых молочных продуктов.

Таблица 5.3 – Органолептическая оценка ферментных препаратов

Показатели	Контроль (сычужный фермент)	Соотношение препаратов 1:1	Протепсин
Запах и вкус	Свойственный стандартному сыру, без посторонних запаха и вкуса	Свойственный данному продукту	Слабая горечь
Консистенция	Плотная (стандартная)	Плотная (стандартная)	Слегка ломкая
Рисунок	Слепой, равномерный	Слепой, равномерный	Равномерный, единичные круглые глазки малого размера
Цвет	Желтый	Желтый	Желтый
Внешний вид	Хороший, стандартный	Хороший, стандартный	Хороший, стандартный

Исследования в этом направлении целесообразно продолжить.

5.4. Получение белковых гидролизатов молочной сыворотки

Молочная сыворотка, получаемая в качестве побочного продукта при производстве сыров, творога и казеина- ценное вторичное сырьё, области его возможного применения трудно переоценить. Результаты обширных исследований проведенных под руководством академика Храмцова А.Г., и убедительно доказывают поистине неограниченные области применения компонентов молочной сыворотки для получения разнообразных полуфабрикатов, напитков, препаратов и т.п. В молочной сыворотке содержится почти половина сухих веществ молока и питательная ценность составляет 36% калорийности цельного коровьего молока.

В сухих веществах сыворотки идентифицировано до 200 различных соединений, в том числе тонкодиспергированный молочный жир (7,5%), белковые вещества (14,5%), минеральные вещества (8,0%), молочный сахар

(70%). По своей химической природе белковые вещества молочной сыворотки близки к белкам крови (альбумин, глобулин); некоторые их фракции обладают иммунными свойствами. Поэтому проблема использования молочной сыворотки, организация её глубокой переработки - одна из важнейших проблем современности. Использование молочной сыворотки неразрывно связано с проблемой охраны окружающей среды. Именно стремление избежать загрязнения рек, водоемов и различных ирригационных сооружений заставляют изыскивать наиболее приемлемые пути её промышленной переработки. В настоящее время определились основные направления промышленной переработки молочной сыворотки:

1. комплексное использование всех составных частей сыворотки (белково-углеводные концентраты, напитки), заменители цельного молока, бактериальные закваски для силосования кормов, напитки и т.д.

2. извлечение отдельных компонентов и их отдельное применение (топленое и сливочное масло, белковая масса, альбуминный творог, сырная масса, молочный сахар, углеводные препараты и кормовые концентраты). В настоящее время широко распространено сгущение, ультрафильтрация, обратный осмос, ферментация и ферментативный гидролиз, сушка. Однако в большей части технологий белки являются балластной фракцией и поэтому применение ферментов протеолитического действия весьма актуально. Интерес к гидролизу белков сыворотки значительно возрастает ввиду высокой аллергенности некоторых белковых фракций. Гидролизаты получены при обработке нативной творожной сыворотки и сухой молочной сыворотки.

На рисунке 5.2 показана сравнительная гидролитическая активность ферментных препаратов по отношению к белкам молочной сыворотки.

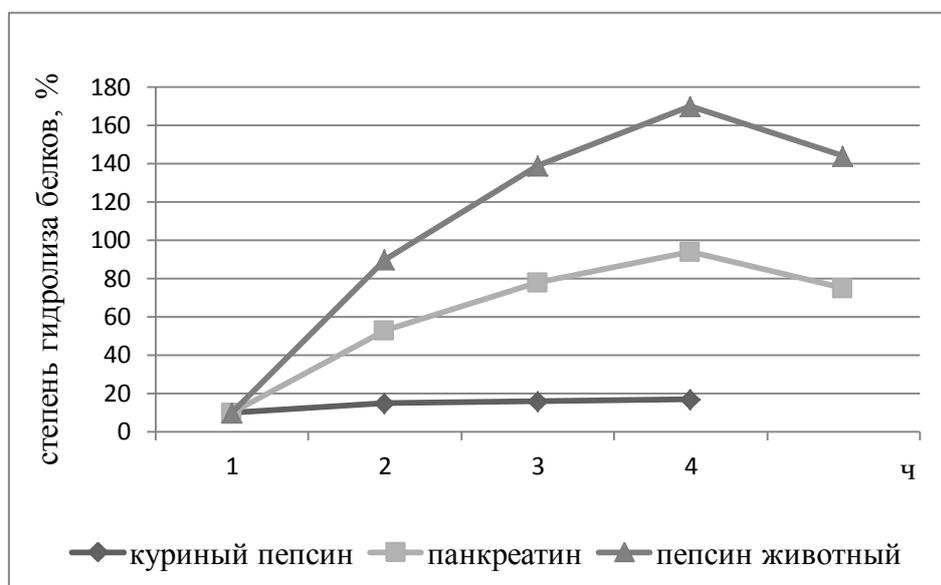


Рисунок 5.2 –Гидролиз белков творожной молочной сыворотки под действием ферментных препаратов; 1- куриный пепсин; 2-панкреатин; 3- пепсин животный; ось ординат - степень гидролиза белков, %

Как видно на рисунке 5.2, активность «Протепсина» к гидролизу белков сыворотки значительно ниже, чем пепсина животных и панкреатина.

При этом показано (рис. 5.2), что под действием «Протепсина» в результате деструкции белков примерно с одинаковой скоростью образуются аминокислоты и пептиды. Гидролиз в течение 2-х часов вызывает максимальное разрушение белковых веществ. «Протепсин» может быть применен для преобразования белков молочной сыворотки, в том числе сухой молочной сыворотки (рис. 5.3).

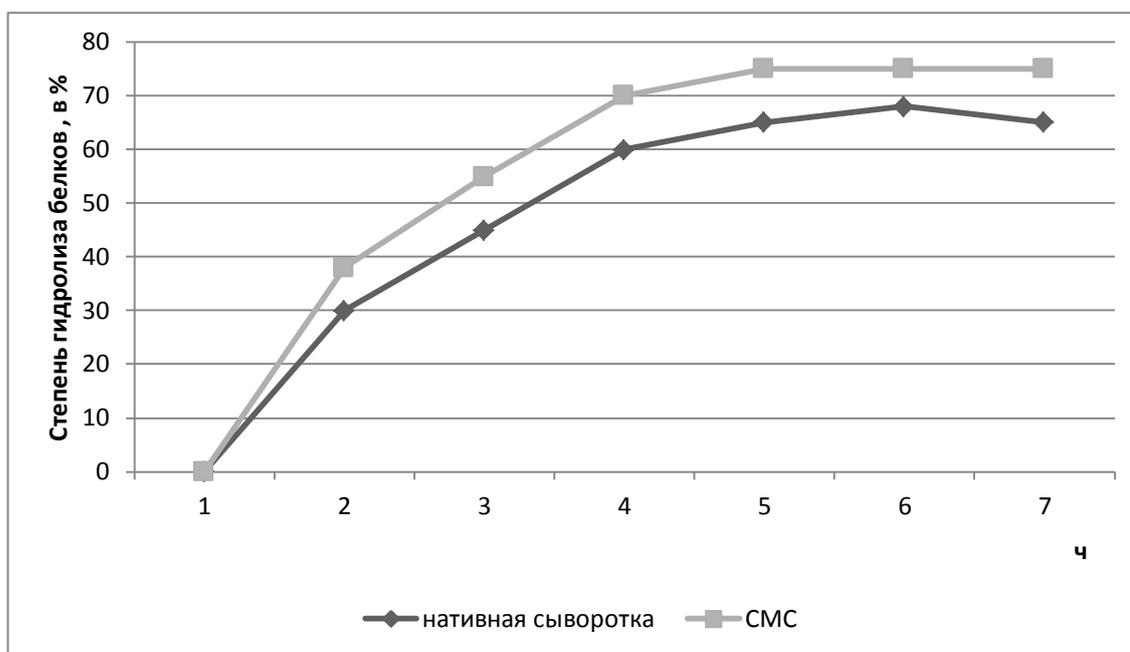


Рисунок 5.3 – Гидролиз белков молочной сыворотки и СМС препаратом «Протеписин»

Таким образом, «Протеписин» применим для гидролиза сывороточных белков. Гидролизаты могут быть использованы для получения гидролизатов с весьма полезными свойствами, в том числе, гипоаллергенностью. Гидролизаты перспективны при фаршесотавлении, в составе напитков, ЗЦМ и т.д.

ЗАКЛЮЕНИЕ

Диссертационное исследование выполнено на актуальную тему в соответствии с Программой развития биотехнологий в России до 2020 года и отвечает направлению мероприятий по обеспечению значительных достижений в области пищевой биотехнологии путем внедрения отечественных ферментных препаратов в реальное производство для увеличения ресурсов сырья животного происхождения и создания конкурентно-способных полноценных продуктов питания новых ассортиментных линеек на принципах ресурсосбережения и импортозамещения.

Обосновано выбранный основной объект исследования – ферментный препарат «Протепсин», производимый ЗАО «Завод эндокринных ферментов» (Россия, Московская область, п. Ржавки), отвечает требованиям по уровню безопасности, биохимической активности, ценовой политике. Препарат обладает общей протеолитической и молокосвертывающей активностями. На базе результатов глубокого изучения физико-химических и биокаталитических свойств препарат рекомендуется к использованию для увеличения ресурсного потенциала мясной и молочной отрасли путем трансформации структуры белков побочного и малоиспользуемого сырья и вовлечения полученного дополнительного объема в рецептурно-компонентные решения пищевых продуктов широкого ассортимента и потребительского спроса.

Установленный фракционный состав протеолитического комплекса, выделение гомогенных фракций, изучение их биохимических особенностей, идентификация функциональных групп каталитического центра, определение субстратной специфичности при гидролизе белков и пептидов позволили спрогнозировать пути рационального применения и апробировать препарат «Протепсин» для обработки различных низкосортных и несортных мясных систем при достижении эффекта адекватной замены традиционного мясного сырья, создания новых ассортиментных линеек, оригинальных продуктов, интенсификации технологических процессов.

Функционально-технологические свойства новых сырьевых мясных источников обеспечивают высокие органолептические показатели, выход, гарантированную безопасность для человека. Пищевая и биологическая ценность удовлетворяет требованиям. Ферментный препарат «Протепсин» апробирован в широком перечне мясных систем с различным содержанием коллагена в модельных опытах и реальном производстве. Результаты дают основание предполагать применение препарата на дальнейшую перспективу для стабилизации сырьевого потенциала отрасли и наращивания объемов производства мясных продуктов.

Положительна оценка перспективности препарата для обработки молочного сырья при гидролизе казеина с молокосвертывающим эффектом и белков молочной сыворотки. Результаты проведенных исследований доказывают возможность замены сычужного фермента в технологии белковых молочных продуктов, а также для модификации свойств молочной сыворотки в расширении возможностей ее применения в различных областях перерабатывающей промышленности.

Обобщенные показатели достижений и расчет экономической целесообразности, достигнутой в условиях реального производства на ряде промышленных предприятий, создание, утверждение и применение пакета технических документов в реализации производств значительного перечня мясных продуктов и при обработке различных потенциальных источников мясного сырья свидетельствует о достигнутых результатах диссертационного исследования в рамках сформулированной цели и задач.

Информация о фракционном составе и свойствах протеолитического комплекса ферментов препарата «Протепсин» открывает перспективу создания на его основе мультиэнзимных композиций для целенаправленного применения при обработке пищевых систем в соответствии с принятым назначением и для решения общих задач прикладной энзимологии.

ВЫВОДЫ

1. Методами электрофореза и хроматографии (на ДЭАЭ – целлюлозе и сефадексе G-100) идентифицировано 2 фермента в составе протеолитического комплекса препарата «Протепсин» (протеиназа IиII), которые обладают общей протеолитической активностью, одна из которых (протеиназа II) – дополнительно молокосвертывающей; молекулярная масса протеиназы I – 71800, протеиназы II – 34500.
2. Протеиназы Iи II активны и стабильны в кислой области рН при температурах, характерных для животных организмов, достоверно отличаются рН- и температурными оптимумами действия (соответственно 4,0 и 45°C, 4,5 и 40°C). Ферменты различаются числом остатков различных аминокислот в первичной структуре, где суммарно определяется около 50% гидрофобных аминокислот, количественно преобладают глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, что соответственно объясняет роль гидрофобных взаимодействий в стабилизации пространственной структуры и активность в области кислых значений рН.
3. Применение независимых методов идентификации и обобщение результатов позволяет констатировать, что в активный центр протеиназы II входят по меньшей мере 2 карбоксильные и какая-либо ароматическая группа аминокислот, фермент проявляет специфичность к гидролизу пептидных связей в белках и пептидах, образованных преимущественно гидрофобными и ароматическими радикалами.
4. Гистоморфологические исследования доказывают, что протеолитические ферменты, действуют на мясные субстраты с различным содержанием соединительной ткани, что приводит к стимулированию функционально-технологических свойств низкосортного сырья, продуктов разделки и обработки туш, увеличению атакуемости мясных белков ферментами желудочно-кишечного тракта, ускорению процессов созревания при сохранении цветности и удовлетворяют микробиологическим требованиям.

5. Препарат «Протепсин» обладает молокосвертывающей активностью и способен гидролизовать казеина молока и белки молочной сыворотки. Имеет сходства и отличия с сычужным ферментом при действии на субстраты; характеризуется более глубоким гидролизом казеина.
6. Обоснованы, апробированы и внедрены ферментные технологии обработки мясного сырья с низкими функционально-технологическими свойствами, что позволяет увеличить ресурсный потенциал отрасли за счет целенаправленного формирования сырья с более высокой сортностью и получения эмульсий высокого качества при ускорении созревания в 1,8-3,0 раза. Разработана и внедрена техническая документация на производство. Апробация в производственных условиях доказала экономическую целесообразность и новизну технических решений в частных технологиях мясопродуктов.
7. Результаты опытно-лабораторных апробаций ферментного препарата «Протепсин» при обработке молочного сырья предполагают перспективу использования в качестве заменителя сычужного фермента в технологии сыров и получении гидролизатов молочной сыворотки, в том числе с гипоаллергенными свойствами.

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frost&Sullivan, Обзор рынка биотехнологий в России и оценка перспектив его развития. - РВК, 2014. – 70 с.
2. Рынок промышленных ферментов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:http://www.lombi-korma.ru/news/25_04_12_3.html
3. Рынок кормовых ферментов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:http://www.soya.news.info/news/mirovoy_rinok_kormovih_fermentovIc_2018_godu_virastet_v_1-5_raza.html.
4. Роспромпортал.[Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.antagro.ru/>
5. Заквасочные и стартовые культуры [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://chr-hansen.ru>
6. TheArtofEnzymes [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://abenzymes.com/>
7. Инбуко. Уральский Федеральный округ. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.inbuso.ru/>
8. Биопродукт. Справочник Московской области. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.bpmarket.ru/>
9. CSKfoodenrichment.[Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.cskfood.com/>
10. Химпартнеры. Химическое сырье.[Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.propartners.ru/>
11. Микробиология. Биотехнология. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://mikrobiki.ru/mikrobiologiya/mikrobiologiya/biotehnologiya-v-rossii-beloe-bezmolvie.html>.
12. Новостной портал. Новости науки. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:http://www.infox.ru/business/company/2010/04/26/Skolkovo_tamojennye_lgoty.phtml.
13. Сиббиофарм. Крахмалопаточная промышленность. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.sibbio.ru/sitenews/>

14. Abercade. Отраслевые новости.[Электронный ресурс]. – Режим доступа:[http:// www.abercade.ru /research/analysis/ 1988.html](http://www.abercade.ru/research/analysis/1988.html).
15. **Нельсон, Д.** Основы биохимии [Текст]: Том 1. / под редакцией Ленинджера. Основы биохимии строения и катализ / Д. Нельсон, М. Кокс. Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 696 с.
16. **Dutta, S.** PDB. Crystal structure of I86F mutant of papain. Resolution [Электронный ресурс]: база данных содержит сведения о генах, молекулах, белках... / S. Dutta, D. Choudhury, S. Roy. – Электрон. дан. - 1.98 Å / 2014-07-02 / PDB ID: 4QRV / Aug 4, 2015
17. **Крахмалева, Т.М.** Пищевая химия [Текст]: учеб. пособие / Т.М. Крахмалева, Э.Ш. Манеева. - Оренбург: Университет, 2012. - 155 с.
18. **Coker A.** Human pepsin 3b. Resolution [Электронный ресурс] / A. Coker, J.V. Cooper. – Электрон. дан.: 2.61 Å / PDB ID : 3UTL / Feb 28. – 2014.
19. **Северин Е.С.** Биохимия [Текст] / Е.С. Северин / под редакцией Северин Е.С. - 5-е изд., М: ГЭОТАР-Медиа, 2009 – 789 с.
20. **Логинова, О.О.** Физико-химические и кинетические свойства гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана [Текст] / О.О. Логинова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов // Биофармацевтический журнал. - 2015, Т.7., № 2. - С. 13-16
21. In silico design and virtual screening of inulinase immobilization ligands with highest affinity / M.S.Kondratyev [et al.] // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. -2015. - Т. 33, № 1. - P.128-129
22. **Kovaleva T.A.** Study on a Few Characteristics on Immobilized Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* as a Perspective Catalyst for Inulin Hydrolysis [Text] / T.A. Kovaleva, M.G.Kholyavka, A.S.Takha // Biotechnology in Russia, 2009. - № 2. - P.73–80.
23. Изучение физико-химических и кинетических свойств комплексного ферментного биопрепарата [Текст] / А.И. Сливкин, А.С. Беленова, Ю.В. Добрина, С.И. Провоторова //

Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. - № 2. - С. 120-123.

24. **Brena, B.M.** Immobilization of Enzymes [Text] / B.M. Brena, F. Batista-Viera / A Literature Survey, 2006–P. 450.

25. **Cao, L.** Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design / WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. – P. 123.

26. **Корнеева, О.С.**

Разработка гетерологической системы экспрессии рекомбинантных ферментов в виде мультиэнзимной композиции на их основе [Текст] / О.С. Корнеева, Д.А. Черенков, А.А. Толкачева // Актуальная биотехнология. - 2014. - № 3 (10). - С. 39.

27. **Güvercin S.** Determination of some kinetic and characteristic properties of glutathione S-transferase from bovine erythrocytes [Text] / S.Güvercin, M. Erat, H.Sakiroğlu // Protein PeptLett, 2008. - V.15(1). - P.6-12.

28. Идентификация географического места происхождения наркотических веществ на основе изотопного анализа углерода и азота [Текст] / Э.М. Галимов, В.С. Севастьянов, Е.В. Кульбачевская, А.А. Голявин // Масс-спектрометрия. - 2004. - Т1(1). - С.1-8.

29. **Пономарев, В.Я.** Оценка генотоксичности новых видов ферментированных мясопродуктов [Текст] / В.Я. Пономарев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2010. - №200. - С. 172-175.

30. **Thirugnanasambandham K.** Enzymatic catalysis treatment method of meat industry wastewater using lacasse [Text] / K.Thirugnanasambandham, V.Sivakumar // J Environ Health Sci Eng. – 2015. - V13. - P.86.

31. Effect of Marination With Proteolytic Enzymes On Quality Of Beef Muscle / D. Istrati, C. Vizireanu, F. Dima, R. Dinică [Text] // St. Cerc. St. CICBIA. - 2012. - V13(1). P.081 – 089.

32. Получение термостабильной липазы с помощью методов компьютерного моделирования и генной инженерии [Текст] / Д.А. Черенков [и др.] // В

- сборнике: Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. - Москва, 2012. - С. 41-43.
33. Направленный дизайн лигандов и ферментов: от идей к успеху [Текст]/М.С.Кондратьев [и др.]// В сборнике: V СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ: Материалы докладов. Ростов-на-Дону, Южный федеральный университет, 2015. - С.91.
34. **Amos, J.** The use of enzymes in the baking industry [Text] / J. Amos // Journal of the Science of Food and Agriculture. - 1955. - V.6, Issue 9. - P.489–495.
35. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends [Text] / Â.S. Melim Miguel [et al.] // Food Industry. - 2013. - p. 321.
36. Пищевые добавки.[Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://xcook.info/dopolnitelnye/pishhevaja-dobavka-e1103-invertazy.html>
37. **Гаврилова, Н.Н.**О кефире и его пользе [Текст]/ Н.Н. Гаврилова, М.В. Баркова, Н.Л. Хилкова // Сетевой научный журнал Орел ГАУ, 2014. - Т.3 - №3. - С. 3-4;
38. **Abu B. Salleh, N.Z.R.**New Lipases and Proteases[Text] /N.Z.R. Abu B. Salleh, A. Rahman, M. Basr. // Nova Science Publishers. - 2006.–С.34-58.
39. **Antipova, L.V.** The experience of enzyme preparations application in the processing of animal origin raw materials [Text] /L.V. Antipova, M.Y.Gorbunkov, S.A. Storublevtsev // European Journal of Natural History. - 2015. - № 2. - P. 42-43.
40. **Антипова, Л.В.**Положительное действие коллагеназы на структуру мясного сырья [Текст]/ Л.В. Антипова, А.И.Албулова, А.А. Донец // Мясная индустрия. – 2002. - №2. - С. 45-47.
41. **Антипова, Л.В.** Перспективы применения препарата «Протепсин» при производстве мясных продуктов [Текст]/Л.В. Антипова, Р.А. Бибишев, О.В. Ларичев // Мясная индустрия, 2006. - № 9. - С. 35 – 37.
42. **Боресков, В.Г.** Использование комплексов ферментных препаратов при производстве деликатесной продукции [Текст]/ В.Г. Боресков, С.А. Докучаев // Мясная индустрия. - 2001. - №7. - С. 38-40.

43. **Боресков, В.Г.** Влияние ферментных препаратов на мышечную и соединительную ткань говядины [Текст]/ В.Г. Боресков, С.А. Докучаев // Мясная индустрия. – 2000. - № 10. - С. 30-32.
44. **Кокоева, В.С.** Разработка рецептуры и технологии консервированных продуктов из баранины с использованием активированного ферментного раствора Протолихете РМ Г20Х[Текст]: автореф.дис...канд техн. наук. - Ставрополь. - 2007. – 156 с.
45. Ферментные препараты в повышении эффективности переработки сырья животного происхождения [Текст]/Л.В. Антипова, М.Ю. Горбунков, С.А. Сторублевцев, М.В. Шопина, А.С. Шкирман // В сборнике: Системный анализ и моделирование процессов управления качеством в инновационном развитии агропромышленного комплекса. Конференция приурочена к 85-летию ВГУИТ и проводится в рамках реализации технологической платформы «Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания». – 2015. – С. 307-311.
46. **Antipova, L.V.** The experience of enzyme preparations application in the processing of animal origin raw materials[Text] /L.V.Antipova, M.Y.Gorbunkov, S.A. Storublevtsev // European Journal of Natural History. – 2015. - №2. - С. 42-43.
47. Биокаталитические технологии в рациональном использовании малоценных отходов переработки животных и птиц[Текст]/Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев, М.В. Горбунков, О.Г. Орехов // В книге: Материалы III отчетной научной конференции за 2013 г. – 2014. – С. 52.
48. **Кудряшов, Л.С.** Ферментированные варено-копченые продукты из NOR-, DFD- и PSE- говядины[Текст]/ Л.С. Кудряшов, Е.В. Стрекалова // Мясная индустрия. – 2008. - №4. - С.21-25.
49. Биотехнологические основы применения препаратов микробиологического синтеза для обработки мясного сырья с пониженными функционально-технологическими свойствами[Текст]/ В.Я. Пономарев [и др.] /Изд-во Казан., гос. технол. ун-та, 2009. -191 с.

50. **Шамханов, Ч.Ю.** Конфирмационные изменения белка кератина при его ферментативном гидролизе [Текст]/ Ч.Ю. Шахманов, Л.В. Антипова, В.Ф. Селеменев // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2012. -№ 2-3.- С. 44-47.
51. Биохимические характеристики процесса ферментативного гидролиза кератинсодержащего сырья птицеперерабатывающей отрасли [Текст]/ Л.В. Антипова, Ч.Ю. Шахманов, О.С. Осминин, И.А. Пожалова//Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2003. - № 5-6. - С. 69-71.
52. **Шамханов, Ч.Ю.** Регулирование функциональных свойств кератиновых белков при их гидролизе ферментными препаратами[Текст]/ Ч.Ю. Шахманов, Л.В. Антипова, О.С. Осминин//Успехи современного естествознания. - 2003. - № 3. - С.81.
53. **Пат. 2406765 30.01.2009 Российская Федерация (51) МПК.** Способ обезволаживания шкурок кроликов с применением ферментного препарата протосубтилина Г10Х [Текст]/ Антипова, Л.В., Василенко О.А., Косенко И.С., Суховеркова А.М.; Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежская государственная технологическая академия». - 20.12.2010, Бюл. № 35. – 6 с.
54. **Shahidi, F.** Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry [Text] / F. Shahidi, Y.V.A. Janak Kamil //Trends in Food Science & Technology. -2001. - P.435-464.
55. **Aehle, W.** Enzymes in Industry[Text] / W. Aehle. - Wiley-WCH VerlagGmbH&Co. Kga, 2008. - 490 p.
56. **Chandrasekaran, M.** Enzymes in Food and Beverage Processing / M.Chandrasekaran. - CRC Press, 2015. – 540p.
57. **Fallah, M.** Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in Staphylococcus aureus media[Text]/ M. Fallah, S. Bahram, S.R. Javadian// Food Sci Nutr.– 2015. - V.3(2). - P.153–157.
58. Применение ферментов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.kristallikov.net/page100.html>.

59. **Луневская, Я.И.** Влияние ферментных препаратов гидролитического действия на бродильную активность спиртовых дрожжей при сбраживании ячменного суслу повышенной концентрации [Текст]/ Я.И. Луневская, Н.В. Баракова // Материалы Международной научно-практической конференции (Воронеж, 25–26 сентября 2014 г.) «Инновационные решения при производстве продуктов питания из растительного сырья», 2014. - С.301.
60. Исследования промышленных рынков. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.abercade.ru/research/analysisZ2135.html>
61. Мировой рынок кормовых ферментов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://xn-0abjdoczpxn-plai/biznes/marketing/2318-mirovoy-rynok-kormovyh-fermentov-stoit-okolo-1-milliarda-dollarov.html>
62. **Супрунов, Д.** Обогащение комбикормов ферментным комплексом для цыплят-бройлеров / Д. Супрунов // Комбикорма. – 2000. - № 1. - С. 47-48.
63. **Алексеева, З.** Использование активированного высокоферментативного корма (АВК) в животноводстве [Текст]/ З. Алексеева, В. Реймер, И. Клемешова // Свиноводство. – 2008. - №3. - С. 18-20
64. Ценовик. Сельскохозяйственное обозрение. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://tsenovik.ru/spravochnik/kormovye-dobavki/kormovye-fermenty7>.
65. **Gurung, N.A** Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond [Text] / N. Gurung, S. Ray, S. Bose, V. Rai / Biomed Res Int., 2013, P.329121.
66. **Adrio, J. L.** Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes [Text]/ J.L. Adrio, A.L. Demain // Biomolecules. – 2014. - V.4(1). - P.117–139.
67. Isolation of a new trypsin inhibitor from the Faba bean (*Vicia faba* cv. Giza 843) with potential medicinal applications [Text] / E.F. [et al.] // Protein PeptLett. – 2011. - V.18(1). - P.64-72.
68. An assessment of human gastric fluid composition as a function of PPI usage [Text] / E. Foltz [et al.] // Physiol Rep. – 2015. - V.3(1). - P. 33-45.

69. **Maugard, T.** Application of hydrolases to the enzymatic synthesis of cosmetic ingredients[Text]/ T. Maugard // SCIENTIFIC STUDY & RESEARCH. – 2003. - V. IV (1 - 2). -P.39-50.
70. Пищевые добавки и консерванты. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.kristallikov.net/page100.html>
71. Журнал о современных достижениях в медицине. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://www.medpulse.ru/health/beauty/news/8640.html>
72. Биологический каталог. Основы биохимии.[Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://bio-cat.ru/ebook.php?file=fillipovich.djvu&page=24>
73. **Бажина, К.А.** Пропионово-кислые бактерии в технологии мясопродуктов[Текст] / К.А. Бажина, О. Зинина. -Sworld, 2014. – Магнитогорск. - С. 6.
74. **Linnemann, A.R.** Toward sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe. Part I. Analysis of the primary links of the production chain[Text] / A.R. Linnemann, D.S. Dijkstra // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. –2002. – V. 42(4). - P.377-401.
75. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications [Text] / J.Y. Nehete, R.S. Bhambar, M.R. Narkhede, S.R. Gawali // Pharmacogn. Rev. – 2013. - V.7(14). - P.107–116.
76. Gluten-free food database: the nutritional quality and cost of packaged gluten-free foods [Text] / B. Missbach [et al.] // PeerJ. – 2015. - V.3. - P. 1337.
77. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering[Text] / Sh. Li, X. Yang, Sh. Yang, M. Zhu, X. Wang // Comput. Struct. Biotechnol. J. – 2012. - V.2. - P.201209017.
78. A biotechnology perspective of fungal proteases [Text] / P.M. de Souza [et al.] // Braz. J. Microbiol. – 2015. - V.46(2). - P. 337–346.
79. Efficacy of reverse micellar extracted fruit bromelain in meat tenderization[Text]/ R.S. Chaurasiya, P.Z. Sakhare, N. Bhaskar, H.U. Hebbar // J. Food. Sci. Technol. –2015. - V.52(6). - P.3870-80.

80. Biomarkers: Non-destructive Method for Predicting Meat Tenderization [Text] / A. Singh, P. Ahluwalia, A. Rafiq, S. Sharma // Crit. Rev. Food Sci.Nutr. –2015. - V6 (0). – P. 36-55.
81. **Zaikov, G.E.** Biocatalysis and Biocatalytic Technologies [Text] / G.E. Zaikov/ Nova Science Pub. Inc.,2006. - 286 p.
82. Современная классификация и характеристика пищевых ферментов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:<http://on-line-wellness.com/viewjoost.php?id=122>
83. **Asghar, A.** Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products [Text] / A. Asghar, K. Samejima, T. Yasui // Crit. Rev. Food Sci.Nutr. - 1985. - V.22(1). - P.27-106.
84. **Kh. I.** Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage [Text] / I. Kh, K. Sallam // LebensonWiss Technol.– 2004. - V.37(8). - P.865–87.
85. **Журавская, Н.К.** Использование протеолитических ферментов и антиоксидантов для производства рубленых полуфабрикатов [Текст] / Н.К. Журавская, О.В. Изотов // Мясная индустрия. - 2002. - №9. - С. 22-25.
86. **Большаков, А.С.** Совершенствование техники посола при производстве соленых продуктов из говядины, баранины и конины [Текст] / А.С. Большаков, М.А. Эстебесов, И.Я. Григорьева, А.Г. Забашта // Обзорная информация, ЦНИИТЭИ мясомолпром. -1981. - 18 с.
87. **Боресков, В.Г.** Перспективные технологии производства изделий с использованием коллагенсодержащего сырья [Текст] / В.Г. Боресков, Г.П. Козюлин, И.А. Ушакова // Мясная индустрия. – 1997. - №8. - С.9-10.
88. **Боресков, В.Г.** Современные отечественные биотехнологии солёных мясных продуктов [Текст] / В.Г. Боресков // Мясная индустрия. – 1998. - №3. - С. 33-34.
89. **Яковлев, О.В.** Использование иммобилизованного ферментного препарата микробного происхождения в технологии фаршевых мясных изделий [Текст] / О.В. Яковлев, В.А. Алексахина, А.Г. Забашта // Современные проблемы

качества мясного сырья и его переработки: тез. докл. межгос. науч. семинара. - Кемерово, 1993. - С. 28.

90. **Яковлев, О.В.** Медико-биологическая оценка использования бактериальных препаратов в выработке мясного продукта типа ветчины в оболочке [Текст]/ О.В. Яковлев, В.А. Алексахина, А.Г. Забашта //Современные проблемы качества мясного сырья и его переработки: тез. докл. межгос. науч. Семинара. – Кемерово,1993. - С. 29.

91. **Lacroix, I.M.** Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins [Text]/I.M. Lacroix, E.C. Li-Chan //Peptides. -2014. -V.54. - P.39-48.

92. **Забашта, А.Г.**Использование низкосортного сырья для производства мясных продуктов [Текст]/ А.Г. Забашта, В.Н. Письменская, Н.Н. Цветкова// Мясная индустрия. – 2002. - № 11. - С. 18-20.

93. **Рогов, И.А.** Создание отечественных лиофилизированных бактериальных препаратов для колбасного производства [Текст]/ И.А. Рогов, В.В. Хорольский// Биотехнологические процессы переработки сельскохозяйственного сырья: сб. тр. ВНИИМП им. В.М. Гобатова, 2002. - С. 43-44.

94. **Румянцева, Г.Н.** Использование микробных ферментов при переработке пищевого растительного сырья[Текст]/ Г.Н. Румянцева // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1993. - №2. - С. 18-19.

95. **Lambert, A.D.**Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat—a review /A. D. Lambert, J.P. Smith, K.L. Dodds // Food Microbiol. -1991. - V.8. - P.267–297.

96. Predictive modeling [Text] / D. A.Baker, C.Genigeorgis, K. L.Dodds, A. H. W.Hauschild //Marcel Dekker, Inc. - 1993. - P.343–406.

97. **Антипова,Л.В.** Прикладнаябиотехнология: учебноепособие[Текст]/ Л.В. Антипова, И.А. Глотова. – Воронеж: Изд-воВоронеж, гос. тех. акад., 2000. - 332 с.

98. **Соколова, Т.В.** Применение ферментных препаратов в народном хозяйстве [Текст]/ Т.В. Соколова // Пищевая промышленность. - 2001. - № 6. - С. 37-38.
99. **Рогов, И.А.** Пищевая биотехнология: учеб.для вузов.[Текст]/ И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева.- М.: Колос, 2004. - 440 с.
100. Производство мясной продукции на основе биотехнологии[Текст]/ А.Б. Лисицын, Н.Н. Липатов, Л.С. Кудряшов, В.А. Алексахина / учеб, для вузов,под общей ред. академика РАСХН Липатова Н.Н. - М.: ВНИИМП, 2005. - 369 с.
101. **Максимюк, Н.Н.** Биотехнологические аспекты переработки белковых отходов животного происхождения [Текст]/ Н.Н. Максимюк, А.Н. Денисенко // Фундаментальные исследования. – 2006. - № 9. - С. 44-45.
102. **Жаринов, А.И.** Пищевая биотехнология: научно- практические решения в АПК[Текст]/ А.И. Жаринов, И.Ф. Горлов / учеб. длявузов - М.: Вестник РАСХН., 2007. - 476 с.
103. ГОСТ 20264.2-88. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности. [Текст] – М.: Изд-во стандартов. – 1988. – 11 с.
104. **Никифорова, А.П.** Бактериальные культуры для улучшения качества варено-копченых продуктов из говядины[Текст]/ А.П. Никифорова, Н.А. Ханхалаева, И.В. Хамаганова // Мясная индустрия. – 2013. - №6. - С. 29-32.
105. **Синицын, А.П.** Активность ферментных препаратов – важнейший критерий их свойств[Текст]/ А.П. Синицын, О.А. Синицына, Е.Г. Кондратьева // Птицеводство. – 2014. - № 12. - С. 36-40.
106. **Лукин,А.А.** Разработка технологии белкового обогатителя для колбасных изделий [Текст]/ А.А. Лукин, С.П. Меренкова // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2015. - № 5 (34). - С. 31-36.
107. **Антипова, Л.В.**Методы исследования мяса и мясных продуктов [Текст]/ Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогова. - М.: КолосС, 2004. – 576 с.
108. **Осминин, О.С.**Модификация нингидринового метода определения продуктов ферментативного гидролиза белков мясного сырья [Текст]/ О.С.

- Осминин, Л.В. Антипова, Ч.Ю. Шахманов // Каталог рефератов и статей международного форума «Аналитика и аналитики». - 2003. - Т.2. - С. 446.
109. **Антипова, Л.В.** Прикладная биотехнология [Текст]: учеб. пособие / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, А.И. Жаринов / учеб. пособие. – Воронеж: Изд-во Воронеж, гос. технол. акад., 2000. - 332 с.
110. Суперпродукция, выделение и очистка функционально активного бактериоферритина Dps E.coli [Текст] / В.О. Покусаева, С.С. Антипов, У.С. Швырева, М.Н. Тутукина, О.Н. Озолинь // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. - Т.12.- № 6. - С. 1011-1017.
111. **Davis, B.J.** Disc electroforesis II. Method and application to human serum protein [Text] / B.J. Davis // Ann. N.Y. Acad. Sci.–1994. - V. 121. - P. 404-427.
112. **Бузун, Т.А.** Определение белка в растениях с помощью амидочерного [Текст] / Т.А. Бузун, К.М. Джемухадзе, Л.Ф. Милешко // Физиол. Растений. – 1982. - Т. 29-1. - С. 198.
113. **Стручкова, И.В.** Теоретические и практические основы првления электрофореза белков в полиакриламидном геле [Текст] / И.В. Стручкова, Е.А. Кальясова / Электронное учебно-методическое пособие, Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. - 60 с.
114. ГОСТ 19496-2013 Мясо. Метод гистологического исследования [Текст]. Введ. 2015.-07.-01. - М.: Изд-во стандартов. – 15 с.
115. Контроль цветности мяса и мясных продуктов на основе методов спектрофотометрии [Текст] / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, В.П. Панов, С.А. Титов // Мясная индустрия. – 2002. - № 8. - С.48-50.
116. ГОСТ 7269-79 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести [Текст]. – Введ. 1980.-01.-01. - М.: Изд-во стандартов, 1979. – 18 с.
117. ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб [Текст]. – Введ. 1974.-01.-01. - М.: Изд-во стандартов, 1973. – 14 с.

118. ГОСТ 9959-91. Продукты мясные. Общие условия проведения органолептической оценки[Текст]. – Введ. 1993.-01.-01. - М.: Изд-во стандартов, 1992. – 14 с.
119. **Журавская, Н.К.** Технохимический контроль производства мяса и мясопродуктов[Текст]/ Н.К. Журавская,Б.Е.Гутник,Н.А.Журавская. -М.: Колос, 1999. - 176 с.
120. **Позняковский, В.М.** Экспертиза мяса и мясопродуктов[Текст]/ В.М. Позняковский. -Новосибирск: изд-во Новосиб. ун-та, 2001. - 526 с.
121. **Адлер, Ю.П.** управление качеством[Текст]/ Ю.П. Адлер. - М.: МИСиС, 2000. - 163 с.
122. **Сысоев, В.В.** Введение в линейное программирование: Методические указания по курсу «Математические методы и модели в расчетах на ЭВМ»[Текст]/ В.В. Сысоев.–Воронеж:Воронеж. Технол. Инст., 1990. - 27с.
123. Выбор ферментных препаратов для обработки рыбных шкур[Текст]/Л.В. Антипова,А.В. Соколов, М.Д. Горбунков, С.А. Сторублевцев // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. – 2014. - № 1 (1). – С. 48-53.
124. **Антипова, Л.В.**Инновационное применение ферментных препаратов для переработки животноводческого сырья [Текст]/Л.В. Антипова,М.В. Горбунков // Инновационное развитие техники пищевых технологий: материалы международной научно-технической конференции. – 2015. – С. 55-61.
125. **Антипова, Л.В.**Ферментный препарат для обработки мяса[Текст]/Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Мясной ряд. – 2014. - №2. – С. 72-73.
126. **Антипова, Л.В.**Ферментные препараты для производства мясных продуктов [Текст]/Л.В. Антипова, М.В. Горбунков, О.Т. Ибрагимова // Материалы III отчетной научной конференции за 2013 г. – 2014. – С. 25.
127. **Антипова, Л.В.**Свойства коммерческого ферментного препарата «Протепсин»[Текст]/Л.В. Антипова, М.В.Горбунков // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2013. - №4 (58). – С. 145-147.

128. **Горбунков, М.В.** Ферментный препарат «Протепсин» в получении эмульсии из коллагенсодержащего сырья [Текст] / М.В. Горбунков, С.А. Сторублевцев // Материалы I Потчетной научной конференции преподавателей и научных сотрудников ВГУИТ за 2014 год, посвященной 85-летию ВГУИТ: в 3 ч. Ч. 1. / под ред. С.Т. Антипова; Воронеж. гос. ун-т инж. технол. – Воронеж: ВГУИТ, 2015. – С. 61.
129. **Антипова, Л.В.** Опыт и перспективы отечественного производства ферментных препаратов для переработки животноводческого сырья [Текст] / Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Материалы конференции 7-й международный биотехнологический форум – выставка РосБиоТех: в 2-х ч. Ч. 2.–М., 2013. – С. 11-14.
130. **Антипова, Л.В.** Новый молокосвертывающий препарат «Протепсин» для создания инновационных решений производства здоровых продуктов питания [Текст] / Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания, 2016. - №1 (9). – С. 66-74.
131. **Антипова, Л.В.** Физико-химические и биокаталитические свойства протеолитического комплекса препарата «Протепсин» [Текст] / Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2016. - № 1. – С. 89-93.
132. **Антипова, Л. В.** Ферментный препарат для обработки мяса / Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Мясной ряд. – 2016. - № 1 (55). – 72-73.
133. Системный анализ и моделирование процессов управления качеством в инновационном развитии АПК [Тест] / Л.В. Антипова, М.В. Горбунков, С.А. Сторублевцев, М.В. Шопина, А.С. Шкирман: мат-лы междунар. науч.-практ. конф. – Воронеж: ВГУИТ, 2015. – С. 307-311.
134. **Антипова, Л.В.** Разработка технологии диетических продуктов из конины с применением биотехнологических методов обработки сырья [Текст] / Л.В. Антипова, Л.А. Зубаирова // Сборник докладов Всероссийской научно-технической конференции – выставки «Высокоэффективные пищевые

технологии, методы и средства для их реализации». – М., 2004. – Ч. I. – С. 131-133.

135. **Антипова, Л.В.** Оценка биологической безвредности колбасных изделий из биомодифицированного мясного сырья [Текст]/ Л.В. Антипова, Р.А. Бибишев // Живые системы и биологическая безопасность населения: материалы V международной научной конференции студентов и молодых ученых. – М.: МГУПБ, 2006. – С. 69-70.

136. **Апраксина, С.К.** Повышение пищевой адекватности коллагенсодержащего сырья ферментативной обработкой[Текст]/ С.К. Апраксина, Р. В. Кащенко // Все о мясе, 2006. - №4. – С. 11-12.

137. **Щербаков, В.Г.** Влияние протеиназ и их ингибиторов на пищевую ценность белков[Текст]/ В.Г. Щербаков, И.А. Москвич //Известия вузов. Пищевая технология. – 2006. - №4. – С. 35-36.

138. **Бойко, О.А.** Воздействие колагенолитического препарата на структуру мясного сырья [Текст]/ О.А. Бойко, Т.Г. Кузнецова // Мясная индустрия. – 2004. - №4. – С. 47-49.

139. **Воронин, Е.С.** Биотехнология[Текст]/ Е.С. Воронин. – Спб.: ГИОРД, 2005. – 358 с.

140. **Голубев, В.Н.** Пищевая биотехнология [Текст]/ В.Н. Голубев, И.Н. Жиганов. – М.: Делипринт, 2001. – С. 61-65.

141. Исследование возможности применения иммобилизованного ферментного препарата митазы для модификации мясного сырья[Текст]/ В.А. Алексахина, Л.А. Пыльцова [и др.]// Экология человека: пищевые технологии и продукты: тез. докл. межд. симп. – Видное, 1995. – С. 63.

142. **Донец, А.А.** Изучение физико-химических свойств ферментных препаратов с целью их применения в мясной промышленности[Текст]/ А.А. Донец, О.А. Василенко // Сборник науч. трудов межвуз. конференции «Социально-экономическое и инновационное развитие России и регионов: реальность и перспективы». –Ч. I. – Орел: Изд-во ОКИ, 2001. – С. 21-22.

143. **Крылова, В.Б.** Биоиндикация коллагенсодержащего сырья молочнокислыми бактериями [Текст]/ В.Б. Крылова, О.Н. Витренко // Мясная индустрия, 2004. - №8. – С. 19-20.
144. **Ксенз, М.В.** Применение протеиназ для повышения усвояемости пищевых белков [Текст]/ М.В. Ксенз // Известия вузов. Пищевая технология, 2002. - №1. – С. 52-55.
145. **Хвыля, С.И.** Микроструктурный анализ в мясной промышленности[Текст]/ С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина, Н.С., Мотылина // Мясные технологии. – 2008. - №4 – С. 48-51.
146. **Соколов, А.Ю.** Новые способы переработки коллагенсодержащего сырья мясной промышленности [Текст]/ А.Ю. Соколов, Л.Ф. Митасева, С.К. Апраксина // Все о мясе. – 2008. - №6. – С. 38-41.
147. **Чернуха, И.М.** Использование ферментированной говядины с различным характером автолиза при производстве копченостей [Текст]/ И.М. Чернуха, А.Н. Захаров, Е.В. Стрекалова // Все о мясе, 2007. - №3. – С. 24-26.
148. Properties and perspectives of a new proteolytic preparations from hydrobionts in technological processing of the meat raw materials [Text]/ L.V.Antipova, L.A. Glotova, A.A. Donets, V.K. Kurchaeva // 46th International Congress of Meat Science and Technology. - Buenos Aires, Argentina, 2000. - 3.1. – P. 32, P. 208-281.
149. Influence of enzyme preparations in feeds of meat productivity of pigs and meat quality [Text]/Sh. Y.Jun, P. Ja.Park, W.K.Jung, Se. K.Kim //International Congress of Meat Science and Technology. – Cape Town, South Africa, 2008. – С. 68. Springer Germany, Heidelberg.
150. **Антонов, В.К.** Химия протеолиза [Текст]/ В.К. Антонов. – М: Наука, 1991. – 504 с.
151. **Гололобов, М.Ю.** Субстратная специфичность протеиназы *Bacillus subtilis* шт. 72 [Текст]/ М.Ю. Гололобов, И.Л. Морозова, Т.Л. Воюшина // Биохимия. – 1991. – Т. 5в - № 2. – С. 123-134.
152. Получение и свойства препаратов иммобилизованной коллагенолитической протеазы из гепатопанкреаса краба

Paralithodescamschatica[Текст]/ О.Н. Зефироваб А.В. Мамаева, В.В. Чупов, Л.И. Валуев, Н.А. Платэ // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32, №5. – С. 510-513.

153. Лактоза и ее производные [Текст]/ Б.М. Синельников, А.Г. Храмцов, И.А. Евдокимов, С.А. Рябцева, А.В. Серов; науч. ред. Акад. РАСХН А.Г. Храмцов. – СПб.: Профессия, 2007. – 768 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Экономическое обоснование использования ферментного препарата «Протепсин»

Препарат Протепсин способствует размягчению соединительной ткани и увеличению влагосвязывающей способности мышечного белка.

Наиболее рациональным представляется его использование для обработки говядины первого сорта с дальнейшим её использованием взамен говядины высшего сорта или говядины второго сорта с дальнейшим её использованием взамен говядины первого сорта.

Рассмотрим удешевление себестоимости 1 тонны мясного сырья обработанного препаратом «Протепсин».

Использовании говядины первого сорта взамен говядины высшего сорта

Вид сырья	Количество, кг	Цена за 1 кг, руб	Стоимость, руб
Говядина 1с	100,000	240,00	24000,00
«Протепсин»	0,01	29100,00	291,00
Вода	5,000	0	0
ИТОГО:	105,000		24291,00

Цена за 1 кг говядины 1 сорта после обработки «Протепсином» - 231,34 руб.

Цена за 1 кг говядины высшего сорта 270,00 руб.

Экономический эффект с 1кг мясного сырья 38,66 руб.

Экономический эффект с 1т мясного сырья 38660,00 руб.

Использовании говядины второго сорта взамен говядины первого сорта

Вид сырья	Количество, кг	Цена за 1 кг, руб	Стоимость, руб
Говядина 2с	100,000	220,00	22000,00
«Протепсин»	0,01	29100,00	291,00
Вода	5,000	0	0
ИТОГО:	105,000		22291,00

Цена за 1 кг говядины 2 сорта после обработки «Протепсином» - 212,30 руб.

Цена за 1 кг говядины 1 сорта 240,00 руб.

Экономический эффект с 1кг мясного сырья 27,70 руб.

Экономический эффект с 1т мясного сырья 27700,00 руб.

Таким образом, использование ферментного препарата обеспечивает снижение стоимости говядины высшего и первого сорта на 14,3% и 11,5 % соответственно.

Для сравнения:

Применение волчков – дожиловщиков и дожиловщиков типа «Баадер» с целью повышения сортности мяса, приводит к повышению себестоимости мясного сырья.

При пропускании односортной говядины через дожиловщик отжиловывается 8-10% соединительной ткани (жилки).

Далее жилка может использоваться только на приготовление колбас второго сорта, поэтому при калькуляции жилка не может быть оценена по той же цене, что и мясо, а разница между ценой жилки и мясом увеличивает цену отжилованного мяса.

При дальнейшей переработке жилки требуются дополнительные трудовые, энергетические и др. затраты, например при приготовлении эмульсии из соединительной ткани.

При обработке мяса на дожиловщике мясо подвергается дополнительному механическому воздействию: нагревается, перетирается, что приводит к потере вкусовых качеств и функциональных свойств мяса.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ им. В. М. ГОРБАТОВА
(ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии)

УТВЕРЖДАЮ

Директор ГНУ ВНИИМП
им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии
Председатель технического комитета по
стандартизации "Мясо и мясная
продукция" (ТК-226)



А.Б. Лисицын

2007 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

**по применению ферментного препарата «Протепсин» фирмы
«Прайм плюс ингредиенты» для производства мясопродуктов**

Дата введения с "3" февраля 2007 г.

Настоящая технологическая инструкция распространяется на применение ферментного препарата «Протепсин» (далее по тексту – «Протепсин») производства ЗАО «Завод эндокринных ферментов», Россия (Московская обл., г.Ржавки), и поставляемого ООО «Прайм Плюс Ингредиенты» на предприятия мясной промышленности.

Ферментный препарат «Протепсин» вырабатывается по ТУ 9219-005-42789257 и имеет Свидетельство о государственной регистрации № 77.99.11.9.У.9108.8.05 от 09.08.2005 г.

1 Назначение

«Протепсин» является технологическим вспомогательным средством, предназначенным для ферментативной обработки мясного сырья при производстве мясопродуктов.

«Протепсин» в качестве вспомогательного средства применяют для обработки:

- низкосортного мясного сырья с целью рационального использования мясных ресурсов, уменьшения устойчивости соединительной ткани к термической обработке, интенсификации технологических процессов его переработки;
- мясного сырья, хранившегося длительное время в замороженном состоянии, с целью повышения его функционально-технологических свойств;
- мясного сырья при посоле с целью увеличения влагосвязывающей способности, повышения выхода и снижения жесткости готовой продукции;
- мяса в парном и охлажденном несозревшем состоянии с целью ускорения его послеубойного созревания и снижения жесткости.

Применение «Протепсина» осуществляют согласно настоящей технологической инструкции, в соответствии с действующими санитарными нормами и правилами, гигиеническими нормативами, предъявляемыми к качеству и безопасности мясопродуктов, утвержденными в установленном порядке.

2 Характеристика

2.1 Общая характеристика

«Протепсин» - коммерческое название ферментного препарата животного происхождения, получаемого из кислого экстракта слизистой оболочки желудков кур, свиней и крупного рогатого скота путем высаливания раствором поваренной соли и последующего высушивания. «Протепсин» содержит комплекс протеолитических ферментов-протеиназ, имеющих по международной европейской системе кодификации пищевых добавок индекс E1101.

В соответствии со спецификациями Европейской комиссии препарат имеет следующие характеристики (Табл.1).

Таблица 1

Характеристика	Содержание или значение характеристики
Технологические функции (назначение)	Ускоритель созревания мяса, усилитель вкуса и аромата, фермент (класс – гидролаза, подкласс - пептидгидролаза)
Систематический номер	3.4.23
Катализируемые реакции	Гидролиз белков с образованием пептидов с низкой молекулярной массой и аминокислот
Физико-химические свойства	Растворим в воде. Практически не растворим в этаноле, хлороформе, эфире
Специфические свойства	Катализирует распад пептидной связи –СО-NH-. Расщепляет почти все белки растительного и животного происхождения
Природный источник	Слизистые оболочки желудков убойных животных и птицы

2.2 Характеристика специфического действия на мясное сырье

2.2.1 Применение «Протепсина» ускоряет процессы гидролитического распада и дезинтеграции белковых структур мяса с образованием пептидов и свободных аминокислот, что способствует размягчению мышечной и соединительной ткани, повышению

влагосвязывающей способности сырья и увеличению выхода готовой продукции с единицы используемого мясного сырья.

2.2.2 Действие на полноценные белки мышечной ткани

«Протепсин», как и все протеазы, действует на полноценные белки мышечной ткани, сначала уменьшая их структурно-механические (прочностные) или вязкостные свойства, затем образуя пептиды, и, наконец, при глубокой стадии гидролиза, аминокислоты.

В мышечной ткани действие препарата сравнимо с действием тканевых ферментов мяса в процессе послеубойного созревания мясного сырья

Препарат наиболее часто и эффективно гидролизует пептидные связи, образованные фенилаланином, лейцином и тирозином. Реже – глутаминовой и аспарагиновой кислотами, аланином, метионином, валином, лизином, серином, гистидином. Пептидные связи, в которых участвуют глицин, изолейцин, пролин, аргинин, цистеин им почти не гидролизуются.

2.2.3 Действие на белки соединительной ткани

«Протепсин» вызывает небольшие, но четкие изменения в структуре коллагена. Основная часть молекулы коллагена полностью устойчива к «Протепсину». В начале препарат действует на сопутствующие вещества, а затем на концевую область молекулы коллагена. Более длительное воздействие способно вызывать дезагрегацию фибриллярных структур и разрушение внутримолекулярных поперечных связей, способствует отщеплению концевых участков молекул коллагена, не участвующих в трехцепочных спиральных (при этом спиральная структура коллагена сохраняется).

Препарат действует на межмолекулярные связи коллагена. При этом происходит распад коллагена до мономерных молекул тропоколлагена, в результате чего нерастворимый коллаген частично переходит в растворимое состояние.

2.2.4 Преимуществом «Протепсина» является то, что для данного препарата не характерна слишком быстрая инактивация при повышении значения рН субстрата. Полная инактивация препарата происходит при 70 °С в течение 15 мин. «Протепсин» не оказывает негативного влияния на органолептические характеристики готового продукта, способствует формированию более выраженного вкуса и аромата.

3 Показатели качества и безопасности

3.1 По органолептическим и физико-химическим показателям и функционально – технологическим характеристикам «Протепсин» должен соответствовать требованиям, указанным в ТУ 9219-005-42789257 и приведенным в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Наименование показателя (характеристика)	Содержание характеристики и значение показателя
Внешний вид и цвет	Однородный порошок от желтовато-серого до светло-серого цвета
Запах	Специфический, свойственный животным протеиназам, без постороннего запаха
Массовая доля хлоридов (поваренной соли), %, не более	95,0
Массовая доля нерастворимого остатка, %, не более	7,5
Массовая доля влаги, %, не более	5,0
Протеолитическая активность* при рН 5,5, ед/г, не менее	50,0

* Графики зависимости протеолитической активности «Протепсина» от значений рН и температуры субстрата приведены в Приложении 1.

Таблица 3

Наименование показателя	Значение показателя
Оптимальное значение рН субстрата	5,5
Значение рН рабочего диапазона действия препарата	от 4,5 до 6,0
Оптимальная температура субстрата, °С	50,0
Значение температуры рабочего диапазона действия препарата, °С	от 4,0 до 75,0

3.2 По содержанию токсичных элементов и микробиологическим показателям «Протепсин» должен соответствовать требованиям СанПиН 2.3.2.1293 (индекс 2.25.13), указанным в таблицах 4 и 5.

Таблица 4

Наименование показателя	Допустимые уровни содержания, не более
Токсичные элементы, мг/кг:	
Свинец	10,0
Мышьяк	3,0

Таблица 5

Наименование показателя		Значение показателя
КМАФАнМ, КОЕ/г, не более		1×10^4
Масса продукта (г), в которой не допускаются:	БГКП (колиформы)	0,1
	E.coli	25,0
	Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы	25,0

3.3 Не допускается в «Протепсине» наличие посторонних (в том числе металло-магнитных) примесей.

4 Входной контроль и приемка «Протепсина»

Для предприятий большой и средней мощности, имеющих собственную лабораторию, входной контроль осуществляется в соответствии программой производственного контроля, согласованной с территориальным уполномоченным органом в установленном порядке. Рекомендуемые методы отбора проб и испытаний приведены в 4.3.3.

4.1 «Протепсин» должен поступать на предприятие в крытых транспортных средствах с соблюдением при транспортировании «Правил перевозки грузов и багажа», действующих на данном виде транспорта.

При этом должны быть соблюдены условия, обеспечивающие сохранность исходного качества препарата и предохранения его от воздействия изменяемой температуры окружающей среды, попадания влаги, загрязнения и радиоактивного облучения.

4.2 На предприятиях мясной промышленности должен осуществляться входной контроль каждой партии «Протепсина». Под партией понимают любое количество препарата, выработанное из однородного сырья на одном технологическом оборудовании за один технологический цикл, одновременно прошедшее приемо-сдаточные испытания и сопровождаемое одним комплектом документов.

Каждая партия «Протепсина» должна сопровождаться копией свидетельства о государственной регистрации и копией паспорта на партию, выданной и заверенной заводом-изготовителем в установленном порядке.

4.3 При приемке партии «Протепсина» приемщик совместно с ответственным представителем лаборатории предприятия, проверяет наличие и правильность оформления сопроводительных документов, состояние упаковки и маркировку.

При внешнем осмотре каждой упаковочной единицы определяют:

- состояние групповой и транспортной тары, отсутствие дефектов упаковочных единиц (нарушение целостности, следы подмокания);
- соответствие маркировки установленным требованиям;
- дату выработки, срок хранения до поступления на предприятие и состояние поступившего «Протепсина».

4.3.1 «Протепсин» должен быть расфасован в двойные пакеты из полиэтиленовой пленки по ГОСТ 10354 или других аналогичных материалов, разрешенных к применению органами Роспотребнадзора. Между пакетами может находиться этикетка с информацией в соответствии с разделом 5 ТУ 9219-005-42789257. Швы полиэтиленовых пакетов должны быть сварными, включая шов загрузочного отверстия. Термосваривание пакетов должно обеспечивать герметичность упаковки.

Пакеты могут быть уложены в групповую тару:

- мешки полиэтиленовые по ГОСТ 17811, швы которых должны быть герметично сварены. В качестве транспортной тары служат мешки бумажные непропитанные, трех- или четырехслойные, открытые по ГОСТ 2226, сшитые или склеенные. Бумажные мешки должны быть зашиты машинным способом нитками по ГОСТ 14961 или по ГОСТ 6309 или синтетическими по действующей нормативно-технической документации с оставлением гребня по всей ширине мешка не менее 3 см. Допускается вместо зашивания бумажных мешков склеивание их клеевой лентой по ГОСТ 18251;

- ящики из гофрированного картона по ГОСТ 13511 или ящики из тарного склеенного картона по ГОСТ 13515, или дощатые и из листовых древесных пород по ГОСТ 10131, по ГОСТ 13358, по ГОСТ 11354, выстланных внутри бумагой оберточной по ГОСТ 8273.

Допускается упаковка препарата в банки полимерные с контролем первого вскрытия для фармацевтических и ветеринарных препаратов, пищевых продуктов по ТУ 9464-001-48801985, или любые другие, разрешенные Роспотребнадзором к применению для контакта с пищевыми продуктами и обеспечивающие сохранность качества препарата при транспортировке и хранении. Полимерные банки могут быть уложены в ящики, указанные в данном пункте.

Ящики из тарного плоского склеенного картона или ящики из гофрированного картона оклеивают лентой клеевой на бумажной основе по ГОСТ 18251. Ящики из древесных пород окантовывают металлической лентой по ГОСТ 3560.

Не допускается наличия в ящиках незаполненного объема (пустого пространства), в котором могут свободно перемещаться при транспортировании упаковки с препаратом. Между упаковками при необходимости прокладывают оберточную бумагу или другими материалами, разрешенными для применения в пищевой промышленности.

На ящике, в который вложены сопроводительные документы, указывают «Документы здесь».

Масса нетто препарата в потребительской упаковке должна быть от 10,0 г до 10,0 кг. Пределы допускаемых отрицательных отклонений должны соответствовать ГОСТ 8.579.

4.3.2 В соответствии с ТУ 9219-005-42789257 маркировка потребительской тары, в которой поставляется «Протепсин», должна соответствовать ГОСТ Р 51074 и содержать следующую информацию:

- наименование, местонахождение изготовителя (юридический адрес, включая страну, и, при несовпадении с юридическим адресом, адрес производителя);
- наименование продукта: «Ферментный препарат «Протепсин»;
- массу нетто;
- товарный знак изготовителя (при его наличии);
- протеолитическую активность;
- способа применения (нормы внесения);
- дату изготовления и упаковывания;
- номер партии;
- срок годности;
- условия хранения;
- обозначение документа, в соответствии с которым препарат изготовлен;
- информацию о подтверждении соответствия (знака соответствия при обязательной сертификации по ГОСТ Р 50460).

Транспортная маркировка должна иметь манипуляционные знаки по ГОСТ 14192, ГОСТ Р 51474 «Боится нагрева», «Не кантовать».

Транспортная маркировка должна быть нанесена на каждую единицу транспортной тары и должна содержать:

- наименование, местонахождение изготовителя (юридический адрес, включая страну, и, при несовпадении с юридическим адресом, адрес производителя);
- наименование продукта: «Ферментный препарат «Протепсин»;
- массу нетто;
- товарный знак изготовителя (при его наличии);
- количество упаковок;
- условия хранения;
- срок годности;
- дату изготовления и упаковывания;

- обозначение документа, в соответствии с которым препарат изготовлен.

Маркировка на потребительской и транспортной таре может содержать дополнительную информацию, в том числе сведения рекламного характера, относящиеся к данному виду и наименованию продукта.

Не допускается использование «Протепсина», поступившего с дефектами упаковочных единиц, без проведения комплексных лабораторных исследований и оценки на соответствие требованиям раздела 3 настоящей технологической инструкции.

4.3.3 Отбор проб и методы испытаний при входном контроле

4.3.3.1 Отбор проб осуществляют в соответствии с ГОСТ 20264.0.

Из испытываемой партии продукции отбирают стерильным инструментом в стерильную посуду точечные пробы, не менее 5, которые соединяют вместе, тщательно перемешивают и получают объединенную пробу массой, достаточной для проведения входного контроля и последующих периодических и/или контрольных испытаний.

Объединенную пробу препарата делят на две равные части, которые помещают в чистые стеклянные банки с притертой пробкой или завинчивающейся крышкой и составляют акт отбора проб. Одну часть направляют в лабораторию для испытаний (проба №1), а другую - хранят на случай арбитражного контроля (проба №2).

Пробу №2 упаковывают, опечатывают, вносят данные в журнал хранения арбитражных проб, и хранят в соответствующих условиях в течение срока годности. Арбитражные пробы используют для проведения периодических или контрольных испытаний.

Отбор проб оформляют актом.

4.3.3.2 Каждую партию «Протепсина» проверяют на органолептические показатели (внешний вид, цвет, запах), которые должны соответствовать п. 3.1 настоящей инструкции.

Для этого из средней пробы № 1 отбирают около 10 г продукта и помещают на гладкую чистую поверхность листа белой бумаги, затем распределяют препарат шпателем слоем около 0,5 см и слегка надавливают другим листом бумаги или шпателем. Определение внешнего вида подготовленного таким образом препарата производят визуально при дневном свете.

Определение запаха производят органолептически при осторожном перемешивании и вдыхании воздуха над пробой препарата, рассыпанного на листе бумаги.

4.3.3.3 Определение общей протеолитической активности «Протепсина» проводят по ГОСТ 20264.2, при значениях pH в диапазоне от 5,3 до 5,7.

4.3.3.4 Определение массовых долей нерастворимого остатка, влаги и поваренной соли – по ОСТ 10 288.

4.3.3.5 Определение микробиологических показателей

Отбор проб препаратов, подготовка их к анализу, общие правила микробиологических исследований - по ГОСТ 26668, ГОСТ 26669, ГОСТ 26670, ГОСТ Р 51446.

Определение:

- количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) проводят по ГОСТ 10444.15.

- бактерий группы кишечных палочек- по ГОСТ Р 50474.

- сальмонелл - по ГОСТ Р 50480.

- E. coli - по ГОСТ 30726.

4.3.3.6 Определение содержания токсичных элементов:

- мышьяка - по ГОСТ 26930, ГОСТ Р 51766;

- свинца - по ГОСТ 26932, ГОСТ Р 51301, ГОСТ 30178, ГОСТ 30538.

Партия препарата считается прошедшей входной контроль, если результаты испытаний средней пробы по контролируемым показателям соответствуют требованиям ТУ 9219-005-42789257 и раздела 3 настоящей инструкции.

При получении неудовлетворительных результатов анализа хотя бы по одному из показателей, проводят повторные испытания удвоенного объема выборки, взятой из той же партии. Результаты повторных анализов являются окончательными и распространяются на всю партию. При неудовлетворительных результатах повторных испытаний всю партию препарата бракуют.

5 Условия хранения «Протепсина»

5.1 Препарат хранят в упакованном виде в сухом, защищенном от света месте, при температуре от 4 до 10 °С и относительной влажности воздуха не более 75 %.

Не допускают хранение препарата в непосредственной близости от отопительных и нагревательных приборов.

5.2 Препарат во вскрытой упаковке хранят не более 10 суток в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 10 °С и влажности воздуха не более 75 %.

5.3 Гарантийный срок годности «Протепсина» в невскрытой упаковке 8 месяцев со дня его изготовления. В процессе хранения свыше 8 месяцев препарат годен к употреблению, но возможно снижение ферментативной активности, что необходимо учитывать при расчете дозировок его применения.

По истечении срока хранения каждую партию препарата непосредственно перед употреблением подвергают проверке по всем показателям. При соответствии требованиями ТУ 9219-005-42789257 и разделом 3 настоящей технологической инструкции срок хранения препарата допускается продлевать еще на один месяц.

6 Технологический процесс производства мясопродуктов с использованием «Протепсина»

6.1 Общие рекомендации при работе с «Протепсином»

При введении в мясное сырье раствора «Протепсина» протекают процессы, сходные с изменениями, наблюдаемыми при естественном созревании мяса под действием собственных внутриклеточных ферментов (катепсинов).

При производстве мясопродуктов невозможно создать условия, оптимальные для действия собственных ферментов мяса, поэтому обработка «Протепсином» позволяет снизить жесткость мяса, существенно (в 2-3 раза) сократить продолжительность технологического процесса, снизить его трудоемкость и энергоемкость. Кроме этого, обработка «Протепсином» обеспечивает деструктивные изменения, приводящие к повышению скорости распределения посолочных веществ, позволяет улучшить структурообразующую способность фарша, консистенцию готового продукта, повысить содержание усвояемых белков. Обработка ферментом способствует повышению пищевой и биологической ценности мясопродуктов.

Применение «Протепсина» целесообразно для производств, испытывающих потребность в быстром и эффективном использовании сырья и в сокращении энергетических и временных затрат на хранение и переработку мяса.

Специфичность действия «Протепсина» проявляется в зависимости от состава субстрата. Мясное сырье по отношению к ферменту является сложным поликомпонентным субстратом, соотношение тканей в котором широко варьируется в зависимости от вида мясного сырья, анатомического происхождения, особенностей животного, от которого оно было получено, а также от различных производственных факторов.

При работе с «Протепсином» для получения стабильного технологического результата необходимо подбирать мясное сырье и строго соблюдать параметры технологического процесса. Изменение этих параметров может свести на нет весь эффект использования ферментов, так как в одних случаях мясо останется жестким, а в других может приобрести мажеобразную консистенцию.

Скорость протекания и глубина ферментативной обработки зависит от концентрации фермента, рН мясного сырья, температуры, продолжительности обработки, наличия в субстрате возможных ингибиторов и т.д. В связи с этим производственно-технологическая служба предприятия в обязательном порядке должна обеспечить:

- согласованность и безаварийность работы всего технологического оборудования, обеспечивающего непрерывность всего технологического процесса;
- точность взвешивания и последующего приготовления и дозирования растворов «Протепсина»;
- равномерность распределения раствора «Протепсина» по всей массе мясного сырья;
- подбор однотипного мясного сырья по содержанию мышечной, жировой и соединительной тканей, а также по величине рН;
- соблюдение установленных в нормативной и/или технической документации температур помещений и мясного сырья при подготовке, созревании и посоле, а также технологических параметров при термической обработке мясопродуктов.

В зависимости от глубины ферментативной обработки достигаемый результат подразделяют на три уровня:

- частичный протеолиз – белковые молекулы частично разрушаются, содержание свободных аминокислот в мясе возрастает, при этом микроскопическая структура мяса полностью сохраняется, а влагосвязывающая способность увеличивается - мясо имеет обычный товарный вид, но становится мягче;
- протеолиз средней степени – расщепление белковых молекул, появление большого количества свободных аминокислот, при этом мясо еще не теряет своей обычной структуры, но размягчается настолько, что легко разминается между пальцами, влагосвязывающая способность снижается;
- глубокий протеолиз – количество свободных аминокислот достигает 20-30% и более к общему содержанию белка, мясо полностью теряет свою структуру, превращаясь в кашеобразную массу, мясо теряет свои функционально-технологические свойства.

Наилучший технологический результат при работе с «Протепсином» будет достигаться при условии протекания лишь частичного протеолиза.

Для контроля глубины протекания протеолиза при отработке технологических режимов производства мясопродуктов из ферментативно обработанного сырья рекомендуется проводить:

- определение небелкового азота (суммы азота полипептидов, аминокислот и других азотистых органических соединений) по методу, изложенному Н.К. Журавской, Л.Т. Алехиной и Л.М. Отряшниковой в книге «Исследование и контроль качества мяса и мясопродуктов» (М., Агропромиздат, 1985, стр. 17-18).

- гистологические исследования по ГОСТ Р 51604, ГОСТ Р 52480.

6.2 Подготовка растворов «Протепсина»

«Протепсин» используют в виде 1%-го раствора. Для его приготовления отвешивают требуемое количество препарата и переносят его в емкость из нержавеющей стали или пластмассы, разрешенной для контакта с пищевыми продуктами. Затем в емкость наливают предварительно нагретую до температуры 35-36 °С питьевую воду, доводя объем раствора до требуемой метки из расчета 10 г сухого препарата на 1 л воды. Полученный раствор перемешивают и выдерживают в течение 15-30 мин. Готовый раствор – слегка мутноватый (допускается наличие небольшого белого осадка на дне емкости), должен иметь рН не ниже 5,0.

Подготовленный раствор используют сразу или после охлаждения до температуры 2-5 °С хранят в течение 24 часов при температуре от 2-4 °С.

6.3 Обработка раствором «Протепсина» мяса в парном и охлажденном состоянии.

С целью ускорения процессов послеубойного созревания говядины, конины, оленины, баранины и мяса других животных его рекомендуется обрабатывать раствором «Протепсина». Обработка «Протепсином» парного (или охлажденного незрелого) мяса позволяет сократить продолжительность созревания до 2-х суток (вместо 5-8 для говядины). При этом количество свободных аминокислот увеличивается в 2-3,5 раза по сравнению с естественным созреванием.

На разделку и обвалку поступает мясное сырье на кости в парном или охлажденном незрелом состоянии. Температура мясного сырья должна быть:

- парного – не ниже 35 °С;
- охлажденного – от 0 до 4 °С.

При использовании парного мяса важно, чтобы соблюдалась ритмичная подача, выделение и обработка мясного сырья. Общая продолжительность технологического процесса от убоя до шприцевания не должна превышать 1,5 ч.

Из парного мясного сырья на кости выделяют бескостные отрубы, которые немедленно направляют на шприцевание.

Охлажденное незрелое мясо на кости разделяют на бескостные отрубы и также направляют на шприцевание. Не рекомендуется, чтобы продолжительность технологического процесса от разделки охлажденного сырья до шприцевания превышала 45 мин.

Выделенное сырье шприцуют рассолом. Рецепт рассола приведена в табл. 6.

Таблица 6

Наименование компонента	Количество компонента, кг на 100 кг рассола
Вода (лед)	74,0
Соль поваренная пищевая	16,0
1 %-ый раствор «Протепсина»	10,0*

* Указанное количество раствора соответствует введению 0,01 % «Протепсина» к массе мясного сырья.

Температура рассола должна быть не выше 5 °С.

Подготовленное сырье шприцуют в количестве 10% рассола к массе сырья. После шприцевания сырье укладывают в тазики, ящики, напольные тележки и выдерживают в течение 2 суток для созревания (для говядины). Рекомендуется проводить созревание мясного сырья в упакованном под вакуумом виде.

Допускается совмещать процесс созревания мясного сырья с массажем.

По окончании процесса созревания мясное сырье направляется на производство преимущественно кусковых мясопродуктов (копчено-вареных, копчено-запеченных продуктов из мяса), ветчинных изделий и т.п.

6.4 Обработка раствором «Протепсина» низкосортного мясного сырья

Низкосортное мясное сырье обрабатывают «Протепсином» с целью более рационального использования мясных ресурсов, уменьшения устойчивости соединительной ткани к термической обработке, интенсификации технологических процессов переработки (за счет сокращения продолжительности посола, измельчения, термической обработки) низкосортного сырья.

«Протепсин» используют для подготовки низкосортного мясного сырья (говядины жилованной 2-го сорта, конины 1 и 2 сортов, баранины, мяса диких животных, говяжьей мясной обрезки, мяса говяжьих голов, сердца говяжьего и свиного, пашины говяжьей, диафрагмы, свиной шкурки, рубца говяжьего, желудков свинных, срезов от разделки и обрядки сырья для полуфабрикатов и копченостей, мяса кур-несушек и др.) при производстве вареных колбасных изделий, полукопченых колбас, паштетов, ветчинных изделий, продуктов из мяса, консервов и пр.

Подготовленное мясное сырье измельчают в волчке через решетку 3-5 мм (для изготовления ветчинных изделий – 5-25 мм). Затем измельченное сырье переносят в мешалку, добавляют поваренную соль из расчета 2,0-2,5 кг на 100 кг сырья и 1 л раствора «Протепсина»¹. Допускается поваренную соль вносить в виде концентрированного 26%-го раствора или добавлять в мешалку до 6 л воды на 100 кг сырья. Добавленная при посоле вода учитывается при составлении рецептуры.

Мясное сырье перемешивают в мешалке в течение 3-5 минут до равномерного распределения поваренной соли по массе сырья. Затем сырье выгружают и выдерживают в течение 12-24 часов при температуре 2-6 °С.

Не рекомендуется при посоле мясного сырья с «Протепсином» добавлять нитрит натрия.

Подготовленное приведенным способом сырье используют при производстве вареных колбасных изделий, полукопченых колбас, паштетов, ветчинных изделий, продуктов из мяса, консервов и пр. согласно рецептурам на конкретные наименования изделий.

При переработке свиной шкурки без предварительного измельчения «Протепсин» рекомендуется вносить в рассол для замачивания шкурки в виде раствора из расчета 2,0 л 1%-го «Протепсина» на 100 л рассола. Наилучший технологический эффект будет достигаться при использовании кислых рассолов, приготовленных с добавлением кислых фосфатов, пищевых кислот и т.п. в соответствии с рекомендациями фирм, поставляю-

¹ При посоле сердца, свиной шкурки, говяжьего рубца и свинных желудков и другого сырья с высоким содержанием соединительной ткани для достижения более быстрого технологического эффекта доза внесения «Протепсина» может быть увеличена до 2 л на 100 кг сырья (0,02 % препарата к массе сырья)..

щих эти пищевые добавки. Дальнейшая обработка свиной шкурки в соответствии с технологическими схемами, установленными в нормативной и/или технической документации (см. «Технологическую инструкцию по изготовлению и применению белкового стабилизатора для производства мясных продуктов»).

6.5 Обработка раствором «Протепсина» охлажденного созревшего мясного сырья при посоле

При производстве вареных колбасных и ветчинных изделий, копчено-вареных и копчено-запеченных продуктов из мяса с целью увеличения влагосвязывающей способности мясного сырья, со значением рН не более 6, и повышения выхода готовой продукции, рекомендуется проводить посол охлажденного созревшего мясного сырья с применением «Протепсина». Ожидаемое увеличение влагосвязывающей способности составляет 5 % - 8 %.

При производстве вареных колбасных изделий из охлажденного созревшего мясного сырья 1%-ый раствор «Протепсина» (из расчета 1,0 л на 100 кг сырья или 0,01 % к массе сырья) вносят в измельченное в волчке мясное сырье, одновременно добавляя поваренную соль (в сухом виде или в виде концентрированного раствора).

Продолжительность посола зависит от степени измельчения и метода посола (табл. 7).

Таблица 7.

Метод посола	Степень измельчения, мм	Продолжительность выдержки, ч
Концентрированным раствором поваренной соли	2-6	6-12
Сухой поваренной солью	2-6	8-16
	8-12	12-24

В случае, если мясное сырье предназначено для использования при производстве продуктов из мяса (копченостей) или ветчинных изделий, 1%-ый раствор «Протепсина» (из расчета 1,0-2,0 л на 100 кг сырья или 0,01 % - 0,02 % к массе сырья) добавляют в рассолы, используемые на предприятии, уменьшая на соответствующее количество долю воды в рецептуре рассола.

Продолжительность массирования мясного сырья с «Протепсином» сокращают на 20-50% в зависимости от вида мясного сырья.

6.6 Обработка раствором «Протепсина» мясного сырья, хранившегося длительное время в замороженном состоянии.

При хранении длительное время (свыше 3 месяцев) мясного сырья в замороженном состоянии в результате денатурационных процессов снижается растворимость белков мышечной ткани, что приводит к значительному снижению функционально-технологических свойств мясного сырья. С целью повышения его функционально-технологических свойств рекомендуется проводить его переработку с добавлением «Протепсина».

Обработку раствором «Протепсина» мясного сырья, хранившегося длительное время в замороженном состоянии, осуществляют с применением способов, описанных в пункте 6.5.

6.7 Рекомендации по использованию пищевых добавок и ингредиентов.

На действие «Протепсина» оказывает положительное влияние аскорбиновая кислота и флавоноиды, содержащиеся в натуральных пряностях и экстрактах и являющиеся активаторами протеиназ мяса.

Ингибиторами «Протепсина» являются диазокарбонильные соединения. Присутствие ионов двухвалентной меди ускоряет ингибирование.

Нитрит натрия замедляет действие «Протепсина».

Наличие в мясной системе пищевых фосфатов, сахаров, пряностей, экстрактов пряностей, как правило, не отражается на действии «Протепсина». Применение пищевых фосфатов в сочетании с «Протепсином» суммарно увеличивает влагосвязывающую способность мясного сырья за счет разного механизма их действия. Однако необходимо следить за тем, чтобы рН мясного сырья, предназначенного для обработки «Протепсином» было не выше 6,0 (даже после внесения фосфатов). При более высоком значении рН эффект от применения «Протепсина» будет снижен.

6.8 Рекомендации по ведению термической обработки мясопродуктов

Для полной инактивации «Протепсина» термическую обработку рекомендуется вести до 70 °С в центре продукта с последующей экспозицией (выдержка) в течение 15 мин. Данные по отсутствию остаточной ферментативной активности при таких параметрах термической обработки приведены в Приложении 2.

7 Характеристика продукции, выработанной с использованием «Протепсина»

По органолептическим, физико-химическим, микробиологическим показателям мясная продукция, изготовленная с применением «Протепсина» должна соответствовать требованиям СанПиН 2.3.2.1078 и технической документации на соответствующий вид и конкретные наименования изделий.

В соответствии с СанПиН 2.3.2.1293 остаточная ферментативная активность в готовой продукции не допускается.

При использовании «Протепсина» в техническую документацию на конкретные наименования продукции должны быть сделаны соответствующие изменения.

8 Маркировка готовой продукции

В соответствии с СанПиН 2.3.2.1293 (пункт 2.25.1) ферменты относят к вспомогательным средствам, используемым, а затем инактивируемым или выводимым из продукта в процессе производства, и в соответствии с ГОСТ Р 51074 (пункт 3.5.5) в маркировке готовых изделий допускается не указывать их наличие в составе продукта.

9 Требования безопасности

9.1 «Протепсин» может вызывать аллергические реакции, поэтому при его использовании необходимо избегать попадания в глаза и дыхательные пути.

9.2 В случае попадания «Протепсина» на слизистую оболочку глаз и дыхательных путей необходимо промыть глаза и прополоскать горло водой или раствором питьевой соды концентрацией 5%.

9.3 Отвешивание и подготовка растворов «Протепсина» должны осуществляться в лаборатории в вытяжном шкафу или в специальном помещении, оборудованном вытяжной вентиляцией.

9.4 Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны должны соответствовать ГОСТ 12.1.005.

9.5 Общие требования по обеспечению пожарной безопасности при хранении и использовании «Протепсина» должны соответствовать ГОСТ 12.1.004.

10 Требования охраны окружающей среды

10.1 Использование, хранение и транспортировка «Протепсина» должны обеспечивать требования в сфере охраны окружающей среды, установленные Федеральными законами «Об охране окружающей среды», «Об отходах производства и потребления» и другими нормативными документами. ;

10.2 Предприятия-изготовители мясной продукции, сбрасывающие производственные сточные воды в водные объекты, обеспечивают требования СанПиН 2.1.5.980, СанПиН 4630, «Правил пользования системами коммунального водоснабжения и канализацией в РФ №167 от 12.02.1999».

10.3 Предприятия-изготовители мясной, сбрасывающие производственные сточные воды в канализации населенных пунктов, обеспечивают требования «Правил приема производственных сточных вод в системы канализации населенных пунктов» (Москва, 1989).

10.4 Предельно допустимые концентрации (ПДК) и ориентировочные допустимые уровни (ОДУ) содержания химических веществ в воде водоемов после смешивания со сбрасываемыми стоками не должны превышать, установленные в ГН 2.1.5.1315, ГН 2.1.5.1316.

РАЗРАБОТАНО

ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова

Зам. директора по научной работе

 И.М. Чернуха

Зав. лабораторией технологии

колбас и полуфабрикатов

 А.А. Семенова

ООО «Руском»

Генеральный директор

 М.В. Горбунков

Приложение 1
(справочное)

Графики зависимости протеолитической активности «Протепсина»
от рН и температуры субстрата

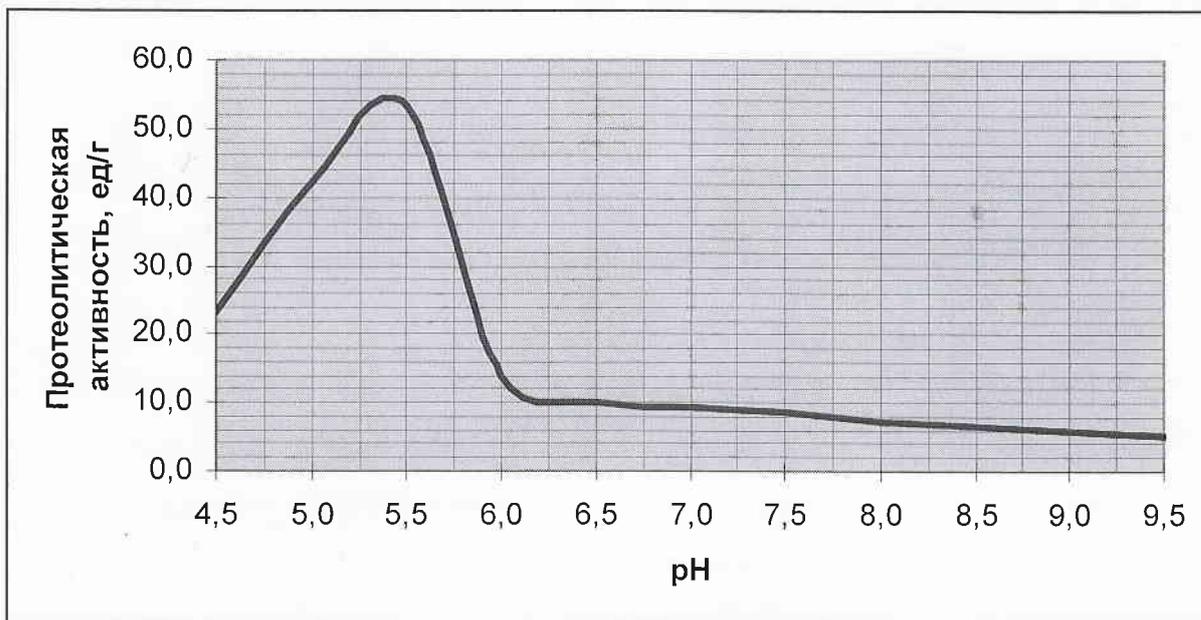


Рис.1 Зависимость протеолитической активности «Протепсина»
от рН субстрата

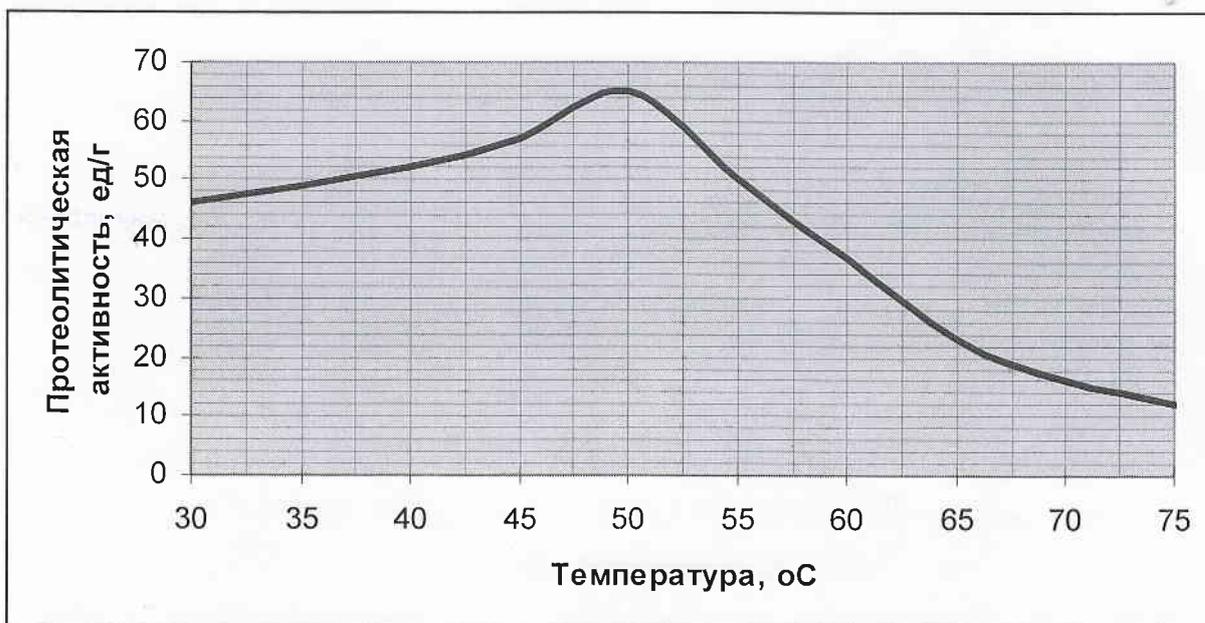


Рис.2 Зависимость протеолитической активности «Протепсина»
от температуры субстрата

Приложение 2
(справочное)
Определение остаточной протеолитической активности «Протепсина»
в сырых и готовых изделиях

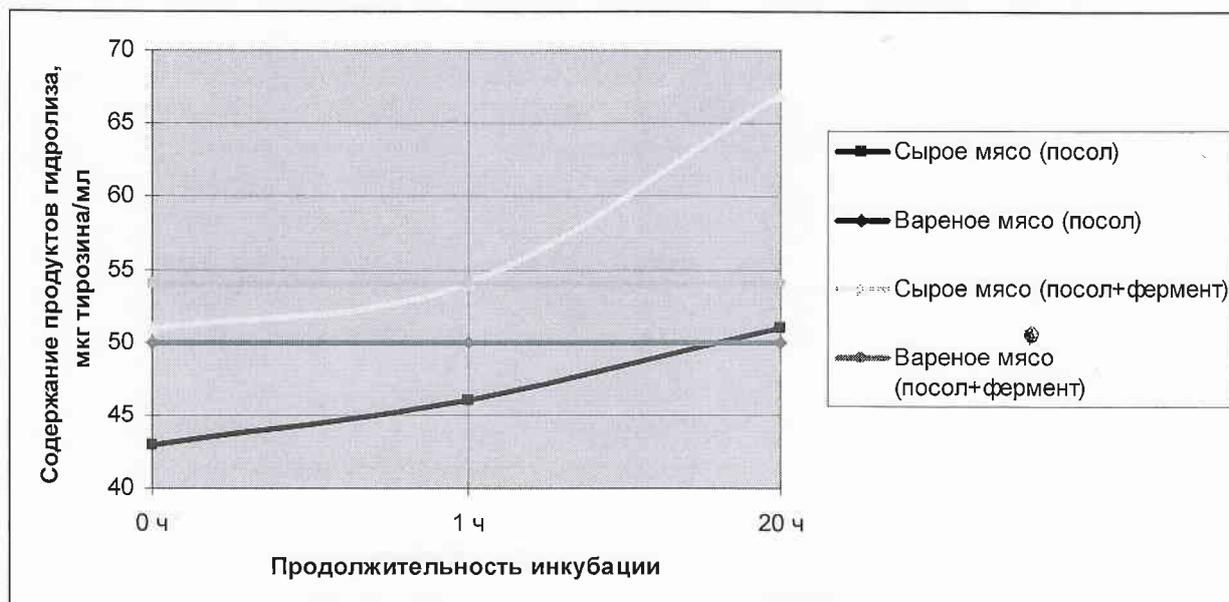


Рис.1 Накопление продуктов гидролиза в безбелковых фильтратах экстрактов из сырого и вареного мяса, подвергнутого посолу и посолу в сочетании с ферментативной обработкой

Литература:

Соловьев В.И., Шумкова И.А., Карпова И.Н. Специфические методы оценки ферментированного мяса. В сб. «Труды ВНИИМП», изд. «Пищевая промышленность», 1969, вып.22, с. 157-167.

Приложение 3
(справочное)

Перечень документов, на которые даны ссылки

Обозначение документа	Наименование документа
ГОСТ Р 50460-92	Знак соответствия при обязательной сертификации. Форма, размеры и технические требования
ГОСТ Р 50474-93 / ГОСТ 30518-97	Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)
ГОСТ Р 50480-93/ ГОСТ 30519-97	Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода <i>Salmonella</i>
ГОСТ Р 51074-2003	Продукты пищевые. Информация для потребителя. Общие требования
ГОСТ Р 51301-99	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрические методы определения содержания токсичных элементов (кадмия, свинца, меди и цинка)
ГОСТ Р 51446-99	Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований
ГОСТ Р 51474-99	Упаковка. Маркировка, указывающая на способ обращения с грузами
ГОСТ Р 51604-2000	Мясо и мясные продукты. Метод гистологической идентификации состава
ГОСТ Р 51766-2001	Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка
ГОСТ Р 52480-2005	Мясо и мясные продукты. Ускоренный гистологический метод определения состава
ГОСТ 8.579-2002	Требования к количеству фасованных товаров в упаковках любого вида при их производстве, расфасовке, продаже и импорте
ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.1.005-88	Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
ГОСТ 2226-82	Мешки бумажные открытые. Технические условия
ГОСТ 3560-73	Лента стальная упаковочная. Технические условия
ГОСТ 6309-87	Нитки хлопчатобумажные швейные
ГОСТ 8273-75	Бумага оберточная. Технические условия
ГОСТ 10131-93	Ящики из древесины и древесных материалов для продукции пищевых отраслей промышленности, сельского хозяйства и спичек. Технические условия
ГОСТ 10354-82	Пленка полиэтиленовая. Технические условия
ГОСТ 10444.15-94	Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ГОСТ 11354-93	Ящики из древесины и древесных материалов многооборотные для продукции пищевых отраслей промышленности и сельского хозяйства. Технические условия
ГОСТ 13358-84	Ящики дощатые для консервов. Технические условия
ГОСТ 13511-91	Ящики из гофрированного картона для пищевых продуктов, спичек, табака и моющих средств. Технические условия
ГОСТ 13515-91	Ящики из тарного плоского склеенного картона для сливочного масла и маргарина. Технические условия
ГОСТ 14192-96	Маркировка грузов
ГОСТ 14961-91	Нитки льняные технические. Технические условия
ГОСТ 17811 -78	Мешки полиэтиленовые. Технические условия
ГОСТ 18251-87	Лента клеевая на бумажной основе. Технические условия
ГОСТ 20264.0-74	Препараты ферментные. Правила приемки и методы отбора проб
ГОСТ 20264.2-88	Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности
ГОСТ 26668-85	Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов
ГОСТ 26669-85	Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов
ГОСТ 26670-91	Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов
ГОСТ 26930-86	Сырье и продукты пищевые. Методы определения мышьяка
ГОСТ 26932-86	Сырье и продукты пищевые. Методы определения свинца
ГОСТ 30178-96	Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов
ГОСТ 30538-97	Продукты пищевые. Методика определения токсичных элементов атомно-эмиссионным методом
ГОСТ 30726-2001	Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида <i>Escherichia coli</i>
ОСТ 10288-2001	Препараты ферментные молокосвертывающие. Технические условия
СанПиН 2.1.5.980-00	Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Санитарные правила и нормы
СанПиН 2.3.2.1078-01	Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы
СанПиН 2.3.2.1293-03	Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы
СанПиН 4630-88	Санитарные правила и нормы по охране поверхностных вод от загрязнений



УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Прайм Плюс Ингредиентс»

М. В. Горбунков

« 02 » февраля

2007г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ по применению «Протепсина»

Введение.

Технология производства мясных продуктов тесно связана с особенностями химического строения и пространственной структуры мясных белков. Их способность изменяться под воздействием воды, электролитов, рН среды, окислителей и восстановителей, нагревания, ферментов и т.д., имеет весьма важное значение в формировании заданных функционально-технологических и органолептических свойств сырья, полуфабрикатов и готовых мясных продуктов, включая формирование коагуляционно-денатурационной структуры фаршевых изделий, сваривание и распад коллагена при доведении продуктов до кулинарной готовности. Дополнительное внесение специфических технологических ферментов существенно ускоряет процессы и изменяет свойства мяса.

Внесение ферментов, обладающих протеолитической и коллагеназной активностями, в мясо и мясные системы особенно эффективно для целей:

- ускорения послеубойного созревания мяса,
- повышения нежности и сочности мяса,
- рационального использования мясных ресурсов,
- интенсификации и эффективности технологических процессов производства

мясопродуктов.

Улучшение качества мяса путем ферментативной обработки перспективно еще и потому, что стоимость мяса относительно высока, а количество требующихся для размягчения ферментов невелико.

Мясные белки.

Массовая доля белков в различных продуктах примерно следующая: в мясе – 22 %, в рыбе – 20 %, в яйце – до 36 %, в молоке – около 3,5 %.

В состав мяса и мясопродуктов входят простые и сложные белки, в том числе водо-, соле-, и щелочерастворимые, обеспечивающие такие важные функции как удержание воды, набухаемость, растворимость, а также характеризующиеся способностью к гидролизу, денатурации и другим превращениям.

В животном комплексе белков на долю миогена приходится около 20%, глобулина X – 20%, миозина – 40%, актина – около 12% от общей массы всех мышечных белков. На каждый из оставшихся белков приходится от 0,1 до 0,3% общей массы.

Саркоплазматические и миофибриллярные белки относятся к полноценным белкам и являются обязательным компонентом пищи. При правильном построении технологии переработки мясного сырья, полученные продукты способны обеспечить организм всеми незаменимыми аминокислотами.

Из белков стромы важную роль следует отвести коллагену, эластину ретикулину, наличие которых определяет прочность соединительных тканей и жесткость мясных систем. Эти фибриллярные белки имеют упрочненную структуру и нерастворимы в обычных растворителях. При смещении рН в кислую сторону от изоэлектрической точки, коллаген способен сильно набухать в водных растворах.

Подобными свойствами обладают эластин и ретикулин.

Способность белков стромы к набуханию имеет большое практическое значение для мясного, желатинового и кожевенного производства. Не смотря на низкую пищевую ценность эти белки необходимы в рационе полноценного питания человека, так как их радиопротекторные свойства активно стимулируют секреторную и двигательную функции желудка и кишечника, оказывают благоприятное действие на состоянии полезной микрофлоры кишечника.

Тканевые ферменты мяса.

В прижизненный период животного в его мышечных тканях огромную роль выполняют внутриклеточные протеолитические ферменты. Они участвуют в катаболизме белков и доставке пластического материала для биосинтетических реакций, образовании и распаде физиологически активных веществ, оказывают прямое воздействие на энзиматический аппарат клетки посредством активации зимогенов или протеолитической модификации самих ферментов и т.д.

В автолитических превращениях мышечной ткани наибольшее значение имеет деятельность двух основных ферментных систем. Одна из них связана с функцией движения, другая – катализирует непрерывный распад главных структурных элементов мышечного волокна, в том числе актомиозинового комплекса.

Именно тканевые ферментные системы мяса регулируют распад белковых веществ в мясном сырье и готовых продуктах. Действие протеолитических ферментов в животных тканях в послеубойный период трудно переоценить. В процессе биохимических превращений белковых и азотистых веществ в мясе накапливаются химические предшественники его вкуса и аромата. Среди ферментов мышечного волокна в прижизненный и послеубойный период главная роль отводится группе катепсинов.

Катепсины являются типичными протеиназами и вызывают деструкцию высокомолекулярных белков. С деятельностью катепсинов, которые во втором периоде автолиза освобождаются из лизосом и активируются кислой реакцией среды клетки, тесно связаны изменения свойств белков.

В результате действия катепсинов на белки при правильном развитии автолитических процессов мяса приобретает нежность, сочность, выраженный вкус и аромат. Характер и глубина автолитических изменений в мясе, влияют на его качество и пищевую ценность.

С целью ускорения процессов происходящих при автолизе мяса, в реальных технологиях все чаще применяют ферментные препараты, обладающие протеолитической и коллагеназной активностями. Введение ферментных препаратов в мясные системы проводят на различных этапах переработки в зависимости от характеристик препарата. Наилучшие препараты являются синергистами внутриклеточных ферментов мяса. Установлено, что для получения высокого эффекта от их применения с целью улучшения качества мяса, эти препараты должны иметь следующие свойства:

- вызывать изменения в соединительной ткани, расщепляя мукополисахаридный комплекс,

- способствовать уменьшению устойчивости соединительной ткани к нагреву,

- стимулировать гидролиз коллагена и эластина,

- действовать в слабокислой или нейтральной среде с максимальной активностью,

- быть безвредными для человека.

Практика применения ферментных препаратов показывает, что не все ферменты, обладающие высокой протеолитической активностью, при обработке мяса дают должный эффект. Некоторые из них, интенсивно катализируя гидролиз белков мышечных волокон, слабо воздействуют на белки соединительной ткани, которые обуславливают жесткость мяса. При этом для обработки мяса имеет большое значение оптимум действия ферментов, природа их активаторов и ингибиторов, специфичность к разрыву пептидных связей при гидролизе животных белков.

Препарат Протепсин.

Протепсин – энзимный препарат животной природы, содержащий комплекс кислых протеиназ, предназначен для применения в мясной промышленности для обработки мясного сырья. Ферментный состав препарата сбалансирован по степени воздействия на различные белки мяса и мясных систем, применяющихся в технологии получения мясных продуктов. Протепсин работает в мясной системе аналогично внутриклеточным ферментам (катепсинам). Он является их синергистом и обладает дополнительными качествами, которые позволяют ему воздействовать в более широком диапазоне технологических параметров, а также влиять на те белковые системы, на которые внутриклеточные ферменты не действуют или оказывают действие в незначительной степени.

Введение Протепсина в мясную систему повышает водосвязывающую способность и гидратацию белков за счет их взаимодействия с активными центрами энзимов. Это приводит к разрыхлению структуры белков, увеличению иммобилизованной влаги в мясе и степени пенетрации. При использовании Протепсина потери веса мясной системы при тепловой обработке уменьшаются.

Общие характеристики Протепсина:

- порошок светло-серого цвета,
- оптимальная температура работы фермента в мясных системах 6-8 °С, при t° 0-4 действие фермента замедляется, поэтому требуется большее время для созревания;
- полная инактивация ферментного комплекса происходит при 70 °С,
- рекомендуемая норма внесения препарата рассчитана на состояние системы рН 4,5-6,2.

Воздействие Протепсина на основные и уникальные белки мясной системы.

Все саркоплазматические и миофибриллярные белки являются легкоусвояемыми полноценными белками. В их состав входят все аминокислоты, включая важнейшую из них – триптофан. Протепсин повышает водосвязывающую способность и гидратацию белков, не разрушая при этом важнейших незаменимых аминокислот. Это приводит к разрыхлению структуры белков, повышению степени пенетрации, увеличению иммобилизованной влаги в мясе и возрастанию его массы на 10-20 %. При последующей тепловой обработке потери веса мясной системы уменьшаются. Для правильного выбора технологических режимов необходимо учитывать рабочий диапазон действия Протепсина и некоторые свойства основных белков.

Миоген. Обычно под миогеном подразумевается вся миогенная фракция. Миоген составляет около 20% всех белков мышечного волокна. Он растворяется в воде, образуя гомогенные растворы небольшой вязкости. Температура денатурации свободного от солей миогена 55-60 °С, изоэлектрическая точка лежит в интервале рН 6,0-6,5.

Глобулин Х составляет около 20% общего количества белковых веществ мышечного волокна. Растворим в солевых растворах даже очень низкой концентрации, температура денатурации при рН 6,5 около 50 °С, изоэлектрическая точка лежит в интервале рН 5,0-5,2.

Миозин. Обычно под миозином подразумевается вся миозиновая фракция. Миозин составляет около 40 % белков клетки мышечной ткани. Температура денатурации миозина около 45-50 °С (у птицы около 51 °С), изоэлектрическая точка при рН 5,4.

Актин составляет 12-15 % всех мышечных белков и является основным компонентом тонких нитей.

Миоглобин – хромопротеид, составляющий в среднем 0,6-1,0 % общего количества белков. Миоглобин хорошо растворим в воде. Температура денатурации около 60 °С. Миоглобин, присоединяя кислород, образует оксимиоглобин светло-красного цвета, который переходит с течением времени в метмиоглобин коричневого цвета. Протепсин создает структуры затрудняющие переход оксимиоглобина в метмиоглобин, что дольше сохраняет товарный вид продукта и не требует применение красителей или снижает их дозу использования.

Из сопоставления свойств белков с рабочим диапазоном Протепсина видно, что его применение в типовых режимах таких технологических операций как массирование, тумблирование и тендеризация может дать значительный положительный эффект. Практика применения Протепсина показывает, что время этих операций сокращается в 3-5 раз. При подготовке говядины целесообразно проведение двухстадийной механической обработки, предусматривая на первой стадии тендеризацию с Протепсином, и на второй стадии тумблирование или массирование в присутствии рассолов, состав которых не должен снижать эффективности ферментных процессов. Особенно важно не включать в состав рассолов добавки подавляющие коллагеназную активность Протепсина, так как она не столь высока, чтобы получить желаемый результат уже на первой стадии механической обработки, а суммарный эффект от воздействия Протепсина на строматические белки может быть весьма высок из-за их уникальных свойств.

Коллаген – фибриллярный белок, имеет упрочненную структуру и нерастворим в обычных растворителях. При смещении рН в кислую сторону от изоэлектрической точки, коллаген способен сильно набухать в водных растворах, увеличивая свою массу в 1,5-2,0 раза, а в состоянии полного набухания может достигать до 1000% по массе.

Эластин и ретикулин обладают свойствами подобными коллагену. Эластин богат глицином, аланином, валином и пролином, суммарное содержание которых в эластине составляет почти 70%. В обычном виде эластин и ретикулин практически не расщепляются пищеварительными ферментами и плохо усваиваются организмом.

Протепсин и компоненты мясных систем и рассолов.

Соль поваренная пищевая. Концентрация поваренной соли в мясной системе от 1,4 до 3,0 % является наиболее приемлемой для действия Протепсина и совпадает с наилучшей органолептической оценкой мясопродуктов. Введение поваренной соли в мясо способствует сдвигу температуры начала коагуляционных процессов при термообработке в высокотемпературную область и тем самым увеличивается время воздействия Протепсина. Если начальное значение рН мяса больше изоэлектрической точки его белковой системы (рН=5,3-5,5), то введение поваренной соли приводит к снижению рН и возрастанию влагосвязывающей способности мясных белков под действием Протепсина.

Сахара. Введение сахаров (сахарозы) улучшает вкус мясопродуктов, повышает стабильность окраски, поддерживает жизнедеятельность молочнокислой микрофлоры. Заметное улучшение вкуса соленых изделий отмечается при введении 1,5-2,5 % сахара к массе сырья. Сахара положительно влияют на действие Протепсина.

Нитрит натрия используют в виде растворов (с концентрацией не выше 2,5 %). Оказывает слабое угнетающее действие на активность Протепсина.

Фосфаты. Наличие фосфатов в мясных системах значительно замедляет действие Протепсина. Введение фосфатов в систему рекомендуется проводить после завершения ферментативных процессов.

Аскорбиновую кислоту применяют для ускорения реакции образования окраски, улучшения внешнего вида и устойчивости цвета при хранении мясопродуктов. Аскорбиновая кислота снижает остаточное содержание нитритов в готовом продукте примерно на 30 %, ингибирует образование нитрозоаминов, усиливает антибактериологические свойства нитрита. На действие Протепсина практического влияния не оказывает.

Горчица активизирует деятельность Протепсина, повышает растворимость белков, обладает бактериостатическим действием.

Подготовка Протепсина к использованию.

Расчетное количество препарата растворяют в чистой питьевой воде с температурой 35-36 °С из расчета 1 г порошка на 100 мл воды. Раствор перемешивают и выдерживают в течение 15-30 минут. Готовый раствор имеет слегка мутноватый опалесцирующий цвет. Допускается наличие небольшого белого осадка на дне.

Способы применения Протепсина.

Раствор Протепсина применяют при приготовлении:

1. деликатесов

1 этап

- 1) 10 гр x10 шт (100 гр) протепсина разводим в 10 литрах теплой воды температурой 35-36 °С, выдерживаем раствор 30 минут.
- 2) Добавляем 88,4 литров холодной воды (возможно добавление льда) и 1,6 кг поваренной соли. Получаем 100 литров рассола для шприцевания
- 3) Шприцуем мясо данным рассолом в количестве 10 % к массе сырья
- 4) Выдерживаем в течение 2-3 часов в холодной камере при температуре 0-4°С.

2 этап

Шприцевание в соответствии с технологией, применяемой на предприятии – не меняя состав рассола.

3 этап

Массирование уменьшается в 2 раза, но для говядины массирование не менее 4 часов.

2. вареных и полукопченых колбас

В мешалке перемешивают 100 кг предварительно измельченного мясного сырья (от 3 до 5 мм) с 1 литром раствора Протепсина и 5 литрами воды в течение 1-2 минут, затем добавляют поваренную соль и перемешивают до равномерного распределения. Выдерживают сырье в течение 12-24 часов. За счет действия ферментов увеличивается влагосвязывающая способность мяса, размягчается соединительная ткань, что способствует применению низкосортного сырья на высшие сорта колбас, снижению потерь массы в натуральной оболочке при термической обработке и повышению выхода готовой продукции.

Рекомендуется проводить процесс куттерования до температуры 14°С.

Примечание: из-за высокой коллагеназной активности Протепсин не рекомендуется применять в производстве колбас с большим содержанием эмульсии из свиной шкурки.

3. Обработка свиных рулек ферментом «Протепсин».

100кг рульки пропускаем через волчок Ø 3. Разводим фермент «Протепсин» - 10г в 1л теплой воды (t 36 °С). Даем отстояться 30 минут. Затем в мешалке перемешиваем мясо, раствор фермента и 4л холодной воды. Через 3-4 минуты добавляем 2% соли, тщательно перемешиваем и оставляем на 20 часов.

Условия и сроки хранения.

Препарат хранят при температуре (18±2) °С в сухом, защищенном от света месте. Срок годности в невскрытой упаковке 8 месяцев. Не допускается хранение препарата в непосредственной близости от нагревательных приборов и отопительных систем.

Во вскрытой упаковке препарат допускается хранить не более 10 суток в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 10 °С и влажности воздуха не более 75 %.

РАЗРАБОТАНО

ООО «Прайм Плюс Ингредиентс»

Главный технолог



Т.И.Кирикова



Антипова Людмила Васильевна
пер. Транспортный, 12
г. Воронеж
394000

На № - от -

Наш № 2015147567/13(073256)

При переписке просим ссылаться на номер заявки и
сообщить дату получения настоящей корреспонденции
от 01.03.2016

Направляем Вам для сведения отчет об информационном поиске, проведенном в соответствии с п. 3 ст. 1386 Гражданского кодекса Российской Федерации, результаты которого будут использованы при проверке патентоспособности заявленного(ых) изобретения(ий).

Документ по результатам проверки патентоспособности будет направлен в Ваш адрес позднее.

Поиск проведен в объеме, предусмотренном п. 26.4 Регламента*.

Приложение: на 1 л. в 1 экз.

Государственный эксперт по интеллектуальной
собственности I категории отдела пищевой
промышленности и сельского хозяйства ФИПС

Э. Е. Крылова
8(499)240-61-48

*Административный регламент исполнения Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам государственной функции по организации приема заявок на изобретение и их рассмотрения, экспертизы и выдачи в установленном порядке патентов Российской Федерации на изобретение зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 20.02.2009, рег. № 13413 (Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти от 25.05.2009 № 21).

01

133402





Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

ОТЧЕТ О ПОИСКЕ

1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЗАЯВКИ		
Регистрационный номер	Дата подачи	
2015147566/13(073255)	05.11.2015	
Приоритет установлен по дате:		
<input checked="" type="checkbox"/> подачи заявки <input type="checkbox"/> поступления дополнительных материалов от _____ к ранее поданной заявке № _____ <input type="checkbox"/> приоритета _____ по первоначальной заявке № _____ из которой данная заявка выделена <input type="checkbox"/> подачи первоначальной заявки № _____ из которой данная заявка выделена <input type="checkbox"/> подачи ранее поданной заявки № _____ <input type="checkbox"/> подачи первой(ых) заявки(ок) в государстве-участнике Парижской конвенции		
(31) Номер первой(ых) заявки(ок)	(32) Дата подачи первой(ых) заявки(ок)	(33) Код страны
1.		
Название изобретения (полезной модели): <input checked="" type="checkbox"/> - как заявлено; <input type="checkbox"/> - уточненное (см. Примечания) СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА ДЕЛИКАТЕСНОЙ ЦЕЛЬНОМЫШЕЧНОЙ КОПЧЕНО-ЗАПЕЧЕНОЙ ПРОДУКЦИИ		
Заявитель: Антипова Л.В., RU, Горбунков М.В., RU		
2. ЕДИНСТВО ИЗОБРЕТЕНИЯ		
<input checked="" type="checkbox"/> соблюдено <input type="checkbox"/> не соблюдено. Пояснения: см. Примечания		
3. ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:		
<input checked="" type="checkbox"/> приняты во внимание все пункты		(см. Примечания)
<input type="checkbox"/> приняты во внимание следующие пункты:		
<input type="checkbox"/> принята во внимание измененная формула изобретения		(см. Примечания)
4. КЛАССИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ) (Указываются индексы МПК и индикатор текущей версии)		
A23L 13/00 (2016.01)		
A23L 13/70 (2016.01)		
5. ОБЛАСТЬ ПОИСКА		
5.1 Проверенный минимум документации РСТ (указывается индексами МПК)		
5.2 Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:		
5.3 Электронные базы данных, использованные при поиске (название базы, и если, возможно, поисковые термины): PatSearch (Россия с 1924г., СНГ, DWPI, Минимум РСТ), Espacenet		
6. ДОКУМЕНТЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ПРЕДМЕТУ ПОИСКА		
Категория*	Наименование документа с указанием (где необходимо) частей, относящихся к предмету поиска	Относится к пункту формулы №
1	2	3
A	РОГОВ И.А. И ДР., Справочник технолога колбасного производства, М.: Колос, 1993, с.356-357	1

1	2	3
A	RU 2523358 C1 (ФГБОУ ВПО "ЮЖНО-УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"), 20.07.2014	1
A	KZ 20066 A4 (ТОВАРИЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"), 15.09.2008	1

<p>*Особые категории ссылочных документов:</p> <p>«А» документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>«Е» более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее</p> <p>«L» документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>«О» документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>«Р» документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> <p>«Т» более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или даты приоритета и не порочащий заявку, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p>	<p>«X» документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска: заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>«У» документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска: заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>«&» документ, являющийся патентом-аналогом</p>
--	---

7. ПРИМЕЧАНИЯ:

8. УДОСТОВЕРЕНИЕ ОТЧЕТА

Настоящий отчет состоит из 1 л.	К отчету приложены копии ссылок на л. в экз.
Дата действительного завершения поиска: 25.02.2016	Должность и подпись уполномоченного лица:
<p>Поисковый орган: ФИПС Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993 Телефон (8-499) 240- 60- 15. Факс (8-495) 531- 63- 18; e-mail: fips@rupto.ru</p>	ГЭпоИС 1 кат. Крылова Э.Е.

9

1	2	3
A	ИНСТИТУТ МЯСНОЙ И МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ), 15.09.1981 SU 1655429 A1 (МОСКОВСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ МЯСНОЙ И МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ, СЕМИПАЛАТИНСКИЙ ИНСТИТУТ МЯСНОЙ И МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ), 15.06.1991	1

***Особые категории ссылочных документов:**

«А» документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным

«Е» более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

«L» документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)

«О» документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.

«Р» документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

«Т» более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или даты приоритета и не порочащий заявку, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение

«X» документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска: заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем в сравнении с документом, взятым в отдельности

«Y» документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста

«&» документ, являющийся патентом-аналогом

7. ПРИМЕЧАНИЯ:

8. УДОСТОВЕРЕНИЕ ОТЧЕТА

Настоящий отчет состоит из 1 л.

К отчету приложены копии ссылок
на л. в экз.

Дата действительного завершения поиска: 01.03.2016

Должность и подпись уполномоченного лица:

Поисковый орган:
ФИПС
Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993
Телефон (8-499) 240-60-15. Факс (8-495) 531-63-18;
e-mail: fips@rupto.ru

ГЭпоИС 1 кат. Крылова Э.Е.

9



ТАМОЖЕННЫЙ СОЮЗ ДЕКЛАРАЦИЯ О СООТВЕТСТВИИ

Заявитель, Закрытое акционерное общество «ЗАВОД ЭНДОКРИННЫХ ФЕРМЕНТОВ»,
ОГРН: 1037739547548, Сведения о государственной регистрации: Межрайонная инспекция
Федеральной налоговой службы № 46 по городу Москве от 22.06.2009 года

Адрес: 124489, Россия, город Москва, город Зеленоград, корпус 602, Фактический адрес:
124489, Россия, город Москва, город Зеленоград, корпус 602, Телефон: 84959446118, Факс:
84959446118, Адрес электронной почты: zakaz@zefbio.ru

в лице директора Ларичева Олега Владимировича

заявляет, что Технологическое вспомогательное средство: ферментный препарат, марка
«ПРОТЕПСИН»

изготовитель Закрытое акционерное общество «ЗАВОД ЭНДОКРИННЫХ ФЕРМЕНТОВ», Адрес:
124489, Россия, город Москва, город Зеленоград, корпус 602, Фактический адрес: 124489, Россия,
город Москва, город Зеленоград, корпус 602, ОГРН: 1037739547548, Телефон: 84959446118, Факс:
84959446118, Адрес электронной почты: zakaz@zefbio.ru, (см. Приложение № 1)

Код ТН ВЭД 3507100000, Серийный выпуск, Продукция изготовлена в соответствии с ТР ТС
021/2011 «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности
пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств», ТР ТС 022/2011
«Пищевая продукция в части её маркировки», ТУ 9219-005-42789257-05

соответствует требованиям

ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 029/2012 «Требования
безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных
средств», ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части её маркировки»

Декларация о соответствии принята на основании

Протокола № 1859-256-200/Р от 16.12.2014 года, Испытательная лаборатория Общества с
ограниченной ответственностью «Ремсервис», аттестат аккредитации регистрационный №
РОСС RU.0001.21AB80 действителен до 21.10.2016 года

Дополнительная информация

Условия хранения продукции в соответствии с требованиями ТР ТС № 021/2011 «О
безопасности пищевой продукции». Срок хранения (годности) указан в прилагаемой к
продукции товаросопроводительной документации и/или на упаковке каждой единицы
продукции.

Декларация о соответствии действительна с даты регистрации по 23.12.2019
включительно

О.В. Ларичев

(инициалы и фамилия руководителя организации-
заявителя или физического лица, зарегистрированного в
качестве индивидуального предпринимателя)



Сведения о регистрации декларации о соответствии:

Регистрационный номер декларации о соответствии: RU.AG66.X-RU.AG66.6.07179

Дата регистрации декларации о соответствии: 24.12.2014

ТАМОЖЕННЫЙ СОЮЗ

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1 лист 1

К ДЕКЛАРАЦИИ О СООТВЕТСТВИИ RU.AG66.X-RU.AG66.6.07179

Перечень предприятий изготовителей продукции, на которую распространяется действие
декларации о соответствии, входящих в состав транснациональной компании

Полное наименование предприятия-изготовителя	Адрес (место нахождения)
Закрытое акционерное общество «ЗАВОД ЭНДОКРИННЫХ ФЕРМЕНТОВ»	171130, Россия, Тверская область, Вышневолоцкий район, поселок Зеленогорский, улица Советская, дом 4а, Вышневолоцкий филиал
Закрытое акционерное общество «ЗАВОД ЭНДОКРИННЫХ ФЕРМЕНТОВ»	141552, Россия, Московская область, Солнечногорский район, поселок Ржавки



Заявитель

О.В. Ларичев

подпись

инициалы, фамилия



ОАО «Останкинский мясоперерабатывающий комбинат»
125254, Москва, Варшавское шоссе, д. 125, стр. 1
Тел.: +7 (495) 619-0011
Факс: +7 (495) 619-0012
E-mail: info@ostanki.ru
www.ostanki.ru
ИНН 50/0100000000
ОГРН 5007003880000

№ 300

ООО «Крист»

г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125, стр. 1

Генеральному директору

Е.В. Шолоховой

ОАО «Останкинский мясоперерабатывающий комбинат» давно и плодотворно сотрудничает с компанией «КРИСТ». Комплексные препараты для колбасных изделий, которые мы используем, заслуживают внимания, но один хочется выделить особенно. Это ферментный препарат животного происхождения «ПРОТЕПСИН», который позволил нам наиболее рационально использовать коллагеновое сырье в производстве пищевых эмульсий холодным способом. Тем самым стабилизировать выпуск качественной, пользующейся популярным спросом продукции.

По заключению нашей технологической службы «ПРОТЕПСИН» – один из лучших препаратов на российском рынке.

С уважением,

Исполнительный директор ОАО «ОМПК»

И.Э. Вьюник

26.09.2013





ЗАО • ЗАВОД ЭНДОКРИННЫХ ФЕРМЕНТОВ •

Юр.адрес: 124489, г. Москва, г. Зеленоград, копр. 602
Почтовый адрес: 141552, Московская обл., Солнечногорский р-н., пос. Ржавки, ЗАО»ЗЭФ»
т/ф. (495) 944-61-18 E-mail: zakaz@zefbio.ru, www.zefbio.ru

Исх. № _____
от 30.01.2014 г.

Генеральному директору
ООО «Крист»
Шолоховой Е.В.

г. Москва

На Ваш запрос, о необходимости предъявления декларации о соответствии на ферментный препарат из животного сырья **ПРОТЕПСИН®** ТУ 9219-005-42789257-2005, регистрационное свидетельство № RU.77.99.26.010.Е.016812.05.11. сообщая.

Препарат **ПРОТЕПСИН®** имеет код ОКП 921900. В соответствии с пунктом 3 статьи 46 закона № 184 ФЗ «О техническом регулировании» и принятом Постановлении Правительства РФ от 1 декабря 2009 г. N 982 «Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подтверждение соответствия которой осуществляется в форме принятия декларации о соответствии». В указанном Перечне в разделе «Единый перечень продукции, подлежащей обязательной сертификации» продукция с кодом ОКП 9219 отсутствует, а в разделе «Единый перечень продукции, подтверждение соответствия которой осуществляется в форме принятия декларации о соответствии» содержится следующее:

«9219 Продукция мясной промышленности прочая

**Корма животного происхождения (включая корма для
непродуктивных животных)**

Продукты яичные»

Из сказанного выше следует, что препарат **ПРОТЕПСИН®** сертификации и принятию
декларации о соответствии не подлежит.

Генеральный директор



Ларичев О.В.

Новинки на рынке

ЗАО - ЗАВОД ЭНДОКРИННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Протепсин

117342, г.Москва, ул.Бутлерова, д.17

Т./ф.: 330-97-52, 330-98-71, 429-88-89

ЗАО «Завод эндокринных ферментов» представляет новый ферментированный препарат из животного сырья.

Протепсин - энзимный препарат животной природы, содержащий комплекс кислых протеиназ, предназначен для применения в мясной промышленности для обработки мясного сырья.

Назначение Протепсина.

Протепсин позволяет рационально использовать мясные ресурсы, интенсифицировать технологические процессы, повышать сочность и нежность мяса, получать экономию сырья, увеличивая при этом объемы выработки высококачественных натуральных мясных продуктов.

Введение Протепсина в мясную систему повышает водосвязывающую способность и гидратацию белков за счет их взаимодействия с активными центрами энзимов. Это приводит к разрыхлению структуры белков, увеличению иммобилизованной влаги в мясе и степени пенетрации.

Увеличение скорости и количества потерь массы происходит при тех же температурах, при которых начинаются денатурационные и заканчиваются коагуляционные процессы в структуре белков мяса.

Сокоотделение при различных температурах отличается и зависит от концентрации препарата. В целом, при использовании Протепсина потери массы при тепловой обработке уменьшаются.

Ферментация мясных систем способствует улучшению физико-химических свойств сырья и позволяет получать продукты с хорошими органолептическими и структурно-механическими показателями.

Норма и условия применения Протепсина.

При производстве мясопродуктов Протепсин применяют в количестве 0,05:0,005 % к массе продукта. Практическое количество вносимого препарата устанавливают частными технологиями, в зависимости от выбранного времени действия препарата на мясную систему. Для выбора времени действия Протепсина необходимо учитывать определенные требования и условия для более эффективного воздействия этого препарата.

Применение Протепсина для некоторых видов продуктов.

При производстве деликатесов раствор Протепсина заливают в массажер при массировании предварительно инъектированного мясного сырья. После массирования с Протепсином продукты не требуют процесса созревания. Для расчета внесения других ингредиентов следует учитывать, что в результате ферментации уменьшаются потери при термической обработке, а выход готового продукта увеличивается на 10-20 %.

При изготовлении полукопченых и вареных колбас раствор Протепсина вносят в смеситель с предварительно измельченным мясным сырьем. За счет действия ферментов увеличивается влагосвязывающая способность мяса, размягчается соединительная ткань, что допускает применение низкосортного сырья на высшие сорта колбас. Протепсин снижает потери массы колбас в натуральной оболочке при термической обработке и повышает выход готовой продукции.

Протепсин применяют в мясной промышленности для умягчения и повышения сочности мяса (полуфабрикатов, колбасных и деликатесных продуктов) *10 грамм препарата рассчитано на 100 кг мяса.*

В молочной промышленности Протепсин применяют для свертывания молока при производстве творога, обезжиренной сырной массы, мягких сыров без созревания.

Мнение эксперта

Антипова Людмила Васильевна – федеральный эксперт научно-технической сферы Минпромнауки и технологий РФ, член совета учебно-методического объединения вузов РФ по образованию в области технологии сырья и продуктов животного происхождения, Почетный работник высшего профессионального образования:

- Последние статистические данные показали: более 60 % мяса поступает для переработки на предприятия Центрального Черноземья с пороками. Эти пороки прогрессируют у животных в результате прижизненных стрессов, возникающих из-за плохой экологии, нарушений технологии содержания, некачественного питания. Мясо таких животных обладает повышенной жесткостью и требует дополнительной обработки.

Сегодня практически на всех крупных предприятиях существует дополнительная операция по обработке мяса – массирование. Но такой способ механического воздействия занимает достаточно много времени и имеет определенные недостатки, связанные с недостаточным вкусообразованием, малой выраженностью запаха. При таком механическом воздействии не развиваются характерные биохимические реакции, результатом которых является формирование химических предшественников, ответственных за вкус и аромат мяса.

И здесь прекрасным выходом из сложившейся ситуации становится использование ферментов. Ферменты оказывают сравнительно «мягкое» воздействие на сырье. При этом накапливаются низкомолекулярные продукты, которые сохраняют естественный мясной вкус и аромат. Таким образом, использование ферментов позволяет сократить сроки массирования, смягчить сырье и, в то же время, сохранить необходимые вкусоароматические компоненты.

Замечательным событием для России в целом стало появление первого сертифицированного ферментного препарата «Протепсин» отечественного производства, рекомендованного для мясной промышленности.

Этот компонент изготавливается исключительно из натурального сырья и по своему составу максимально приближен пепсину – основному пищеварительному ферменту, который вырабатывается в желудке человека. «Протепсин», оказывая аналогичное воздействие на ткани мяса, в то же время доводит его до необходимого «функционального» состояния, придавая мясу дополнительную влагоудерживающую способность и необходимый умягчающий эффект. При этом повышается перевариваемость готовых продуктов, а, следовательно, увеличивается биологическая ценность.

Появление на отечественном рынке этого препарата открывает огромные перспективы для развития различных направлений мясной отрасли. Например, конина, являясь отличным источником диетических продуктов, не достаточно широко используется в современном мясоперерабатывающем производстве из-за повышенной жесткости мяса. Как показали испытания, проведенные сотрудниками нашей кафедры, «Протепсин» легко справляется с этой проблемой, открывая новые возможности в расширении ассортимента мясной продукции из конины и частично решая проблему мясного дефицита.

Так же «Протепсин» непременно окажет положительное влияние и на сферу по производству полуфабрикатов. Этот фермент просто не заменим для приготовления блюд типа антрекотов, бифштексов, ромштексов, шницелей, отбивных, для которых должна использоваться только вырезка (а ее выход составляет всего лишь 0,09 %). Но введение ферментированного препарата типа «Протепсин» делает возможным использование мяса более низких сортов для приготовления этих блюд. Под воздействием этого фермента в процессе жарки мясо не только приобретает необходимую мягкость, но и становится более легко усвояемым.

Наша кафедра совместно с сотрудниками Казанского Государственного Университета провела исследования «Протепсина» на наличие геноповреждающего эффекта. Было установлено, что этот фермент не оказывает практически никакого воздействия на ДНК человека. Кроме того, этот препарат по своему составу близок человеческим ферментам и в то же время повышает коэффициент усвояемости мяса в несколько раз. Это уже доказано.

Как и большинство ферментированных препаратов, «Протепсин», являясь белком, расщепляется в организме человека и либо выводится в процессе метаболизма, либо идет на строение новых тканей. В связи с этим он безвреден для организма человека.

Силами нашей кафедры уже началась разработка ТУ на эту продукцию для адаптации препарата на предприятиях Центрального Черноземья. В ближайшее время наши производители получат возможность для работы с «Протепсином».

Хочется отметить, что в техническом плане этот препарат очень легко внедрить в крупномасштабное производство. Для чего не потребуются капитальных вложений, переориентации основного производства, замены оборудования.

Специфика его действия позволит решать не только проблемы жесткости мясного сырья, интенсификации процесса посола, увеличения выхода мяса высших сортов, вовлечения в производство нетрадиционных мясных ресурсов с высокой долей соединительнотканых включений; но и рационально использовать малоценные вторичные продукты переработки мяса. Можно сказать, что «Протепсин» на сегодняшний день является панацеей для решения многих важных задач.



SOEX

АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
"СОЮЗЭКСПЕРТИЗА"

ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННОЙ ПАЛАТЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ifia Член Международной Федерации
Исследовательских Агентств (IFIA), Лондон



Фирма "АГРОЭКСПОСЕРВИС"

Международный конкурс в номинации
«Лучшие ингредиенты для агропромышленного комплекса»
На 17-ой Международной выставке
«АГРОПРОДМАШ-2012»
Москва, ЗАО «Экспоцентр», 08-12 октября 2012 года

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ

ОБРАЗЕЦ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА
«ПРОТЕПСИН»

ООО «Криет»

Россия, г. Москва, Варшавское ш., д. 125, стр. 1

Москва, ЗАО «Экспоцентр», 08-12 октября 2012 года

Заместитель
Генерального директора
ЗАО «ЭКСПОЦЕНТР»

Генеральный директор
АНО «СОЮЗЭКСПЕРТИЗА»
ТПП РФ

М.П. Толкачев

В.А. Голицын

Реестр АНО «СОЮЗЭКСПЕРТИЗА» ТПП РФ, регистрационный №АГР-06



SOEX

АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
«СОЮЗЭКСПЕРТИЗА»
ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННОЙ ПАЛАТЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ifia

Член Международной Федерации
Испытательных Лабораторий (IFIA), Лондон



Фирма «АГРОЭКСПОСЕРВИС»

Международный конкурс в номинации
«Лучшие ингредиенты для агропромышленного комплекса»
На 15-ой Международной выставке
«АГРОПРОДМАШ-2010»
Москва, ЗАО «Экспоцентр», 11-15 октября 2010 года

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ
ЗА ВЫСОКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА

ОБРАЗЕЦ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА
«ПРОТЕПСИН»

ООО «Крист»

Россия, г. Москва, Варшавское ш., д. 125, стр. 1

Москва, ЗАО «Экспоцентр», 11-15 октября 2010 года

Заместитель
Генерального директора
ЗАО «ЭКСПОЦЕНТР»

Генеральный директор
АНО «СОЮЗЭКСПЕРТИЗА»
ТПП РФ

М.П. Толкачев

В.А. Голицын

Реестр АНО «СОЮЗЭКСПЕРТИЗА» ТПП РФ, регистрационный №АГР-90