

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»**

Институт биохимии имени А.Н. Баха

На правах рукописи



Волчок Анастасия Александровна

**НОВЫЕ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДЛЯ
ДЕСТРУКЦИИ ПОЛИСАХАРИДОВ ПЛОДОВОГО
СЫРЬЯ В УСЛОВИЯХ ВИНОДЕЛЬЧЕСКОГО
ПРОИЗВОДСТВА**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., проф. А.П. Сеницын

Москва 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 9 |
| ГЛАВА 1 ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА ФРУКТОВЫХ И ВИНОГРАДНЫХ ВИН..... | 9 |
| 1.1 Основы технологии фруктовых вин..... | 9 |
| 1.2 Основы технологии виноградных вин..... | 10 |
| 1.3 Технологические проблемы, связанные с переработкой плодов и ягод. Методы их решения..... | 13 |
| ГЛАВА 2 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ ПЛОДОВ И ЯГОД НА ПРИМЕРЕ ВИНОДЕЛЬЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ..... | 17 |
| 2.1 Основы ферментативного гидролиза компонентов растительного сырья..... | 17 |
| 2.1.1 Строение растительной клетки..... | 17 |
| 2.1.2 Химический состав сырья..... | 19 |
| 2.1.3 Ферменты, участвующие в биоконверсии компонентов растительного сырья..... | 23 |
| 2.2 Опыт использования ферментных препаратов в виноградном и фруктовом виноделии..... | 26 |
| 2.3 Ферментативная обработка плодового сырья различного состава. Преимущества использования комплексных ферментных препаратов..... | 28 |
| 2.4 Возможности применения ферментов при переработке отходов плодового сырья и винограда..... | 31 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 36 |
| ГЛАВА 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 36 |
| 3.1 Материалы..... | 36 |
| 3.2 Методы исследования..... | 39 |
| РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 55 |
| ГЛАВА 4 СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ..... | 55 |
| 4.1 Свойства исследуемых лабораторных ферментных препаратов..... | 55 |
| 4.2 Свойства используемых в работе коммерческих ферментных препаратов..... | 57 |
| ГЛАВА 5 РЕЗУЛЬТАТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ..... | 62 |

| | |
|---|-----|
| 5.1 Результаты ферментативной обработки плодового сырья..... | 62 |
| 5.2 Результаты ферментативной обработки технических сортов винограда..... | 74 |
| ГЛАВА 6 ИЗГОТОВЛЕНИЕ ФРУКТОВЫХ И ВИНОГРАДНЫХ ВИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ..... | 82 |
| 6.1 Влияние ферментных препаратов на выход самотечных и прессовых фракций сусла, полученных в процессе изготовления фруктовых и виноградных вин..... | 86 |
| 6.2 Физические показатели самотечных и прессовых фракций сусла, полученных в процессе изготовления фруктовых и виноградных вин с помощью ферментных препаратов..... | 87 |
| 6.3 Физико-химические показатели полученных с помощью ферментных препаратов фруктовых и виноградных вин | 89 |
| 6.4 Органолептическая оценка полученных фруктовых и виноградных вин | 93 |
| ГЛАВА 7 СОСТАВ ЭКСТРАКТОВ СБРОЖЕННЫХ ВИНОГРАДНЫХ ВЫЖИМОК, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ..... | 98 |
| 7.1 Накопление сахаров и глюкозы в гидролизатах сброженных виноградных выжимок в процессе ферментативной обработки..... | 98 |
| 7.2 Накопление веществ фенольной природы в гидролизатах сброженных виноградных выжимок | 101 |
| ГЛАВА 8 ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА VI 7.7..... | 105 |
| 8.1 Содержание микотоксинов в ферментном препарате <i>Penicillium verruculosum</i> VI 7.7..... | 105 |
| 8.2 Содержание микотоксинов в винах, полученных с использованием ферментного препарата <i>Penicillium verruculosum</i> VI 7.7..... | 106 |
| 8.3 Показатели острой токсичности ферментного препарата <i>Penicillium verruculosum</i> VI 7.7..... | 107 |
| 8.4 Аллергическая реакция иммунных комплексов крыс на ферментный препарат <i>Penicillium verruculosum</i> VI 7.7 | 110 |
| 8.5 Аллергизирующее действие ферментного препарата <i>Penicillium verruculosum</i> VI 7.7 и вина, полученного с его использованием, при внутрижелудочном введении крысам..... | 110 |
| ВЫВОДЫ..... | 117 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 119 |
| Приложение А..... | 133 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФП – ферментный препарат

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИФА – иммуноферментный анализ

ФП ВІ 7.4 – ферментный препарат *Penicillium verruculosum* ВІ 7.4

ФП ВІ 7.7 – ферментный препарат *Penicillium verruculosum* ВІ 7.7

ОВ-система – окислительно-восстановительная система

ИЭП – импульсное электрическое поле

ПЕЛ – пектинлиаза

ПГ – полигалактуроназа

ЭГ – эндо-1,4- β -глюканаза

ЦБГ – целлобиогидролаза

БГЛ – β -глюкозидаза

СОП – стандартная операционная процедура

ПААГ – полиакриламидный гель

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

КМЦ - карбоксиметилцеллюлоза

пНФГ - п-нитрофинил- β -D-глюкопираноид

ВС – восстанавливающие сахара

ССБТ – система стандартов безопасности труда

КЖ – культуральная жидкость

ИЭЛ – интраэпителиальные лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рациональные пути развития в области производства, связанного с переработкой плодового и ягодного сырья, в большинстве своем направлены на разработку ресурсосберегающих экологических технологий и процессов. Перед производителями стоят задачи самокупаемости и конкурентоспособности продукции на рынке, растет их вклад в создание научно-исследовательской базы отрасли, непрерывно ведется техническая модернизация, освоение новых технологий, целенаправленная работа по улучшению и контролю качества продукции.

Предварительная ферментативная обработка плодовой мякоти является одним из наиболее эффективных методов интенсификации ряда технологических процессов (прессование, осветление, фильтрация), позволяющих получить из неё больше сока, насыщенного вкусовыми и питательными веществами. Такая обработка основана на разрушении ферментными препаратами (ФП) ряда полисахаридов в составе растительной клеточной стенки, что обусловлено присутствием в их составе целлюлаз, гемицеллюлаз, пектиназ.

Ассортимент ФП, используемых в отечественном винодельческом производстве, весьма широк. Коммерческие ФП отличаются по составу, наличием тех или иных активностей и их соотношением, поэтому их выбор в каждом конкретном случае должен определяться поставленной задачей, свойствами используемого сырья и параметрами предложенного технологического процесса.

Данная работа, связанная с созданием технологий получения суслу повышенного качества и интенсификации его выделения из плодовой мякоти с помощью полученных впервые новых ФП грибного происхождения. Её актуальность обусловлена тем, что отвечает потребностям производителей соковой и винодельческой продукции.

Цель исследования

Целью исследования являлось доказательство возможности и преимущества использования новых, созданных для интенсификации процессов переработки плодового сырья ФП, в состав которых входил комплекс целлюлаз, β -глюкозидаза и пектинлиаза, в процессах производства виноградных и фруктовых вин, как столовых, так и натуральных десертных, а также определение возможности применения ферментативной обработки при извлечении ценных веществ из отходов винодельческого производства.

Задачи исследования

В соответствии с поставленной целью проводимого исследования необходимо было решить следующие задачи:

- Получить ФП на основе штаммов-продуцентов, созданных в лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН.
- Охарактеризовать полученные ФП с точки зрения соотношения в них ферментативных активностей и их компонентного состава.
- Выявить наиболее эффективные ФП для обработки мезги различного растительного сырья.
- Подобрать оптимальные дозировки ФП, а также режимы ферментативной обработки для каждого из использованных типа мезги.
- Изготовить ряд виноградных и фруктовых виноматериалов, описать их характеристики.
- Подтвердить целесообразность применения новых лабораторных ФП при изготовлении вин посредством выявления увеличения выхода сока при использовании предлагаемой технологии переработки мезги и сохранения или улучшения физико-химических показателей полупродуктов (сусла) и готовых вин.
- Получить с помощью комплексных ФП гидролизаты сброженных виноградных выжимок (отходов винодельческого производства) и установить перспективы получения на их основе фенольных экстрактов.
- Установить показатели безопасности и исследовать аллергизирующие свойства наиболее эффективного лабораторного ФП на животных моделях, установить концентрацию микотоксинов в ФП, а также в получаемых виноматериалах.

Методы исследования

В ходе проводимых исследований использовались следующие методики экспериментов: метод электрофореза белков («SDS-форез»); метод определения концентрации белка по Лоури; методики определения активности ФП по отношению к различным полисахаридным субстратам; метод определения концентрации восстанавливающих сахаров (ВС) в растворе (метод Шомоди-Нельсона); метод определения глюкозы с помощью коммерческих реактивов «Фотоглюкоза»; методики определения интенсивности выхода сока из растительных субстратов и физических характеристик сока; физико-химические методы исследования получаемых в ходе работы виноматериалов; методика определения содержания фенольных веществ в гидролизатах виноградных выжимок с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ); метод иммуноферментного анализа (ИФА), выявляющий содержание микотоксинов в исследуемых препаратах и образцах вин; метод предобработки образцов виноматериалов для проведения ИФА-анализа; методы определения токсичности и аллергизирующих свойств ФП на лабораторных животных (крысах Wistar и Norway Brown).

Научная новизна и практическая значимость

Впервые была проведена оптимизация состава сред культивирования рекомбинантных штаммов *Penicillium verruculosum* РВ4 и РВ7 с целью эффективного продуцирования

пектолитических и целлюлолитических ферментов с сокращением сырьевых затрат. Получены сухие формы ФП, позволяющие добиться эффективного разрушения различных групп полисахаридов растительной клеточной стенки, что открывает перспективы их использования в соковой и винодельческой промышленности.

Осуществлена обработка различных видов плодового сырья новыми мультиферментными комплексами карбогидраз, разработана технология получения фруктовых и виноградных вин, включающая стадию ферментативной предобработки мезги. Выявлены возможности переработки отходов винодельческого производства с помощью новых ФП.

Основными преимуществами использования исследуемых новых ФП стали: повышение выхода плодового сусла из мезги, увеличение содержания в нем ароматобразующих, красящих и других экстрактивных веществ, облегчение прессования мезги, лучшее осветление виноматериалов и обеспечение их стабильности, увеличение скорости их фильтрации, снижение расхода оклеивающих и фильтрующих материалов, безопасность использования.

Разработанные технологические схемы получения вин, включающие ферментативную обработку растительного сырья новыми ФП, позволяют ускорить технологические процессы, получить сусло с улучшенными реологическими свойствами, увеличить выход из растительного сырья наиболее ценных, самотечных фракций сусла.

В ходе работы проведены эксперименты, направленные на выявление токсикологических и аллергизирующих свойств новых ФП и подтверждающие безопасность их использования.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Исследования проводились корректно, в ходе работы использовались многочисленные справочные материалы, нормативные документы, учебные пособия и научные публикации. Достоверность и статистическая значимость результатов подтверждена с помощью методов статистического анализа данных и не вызывает сомнений.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. ФП, полученные с помощью модифицированных штаммов *P. verruculosum* включили в себя целлюлолитический комплекс, пектинлиазу и β -глюкозидазу в соотношении, обуславливающим их способность существенно интенсифицировать расщепление полисахаридов плодового сырья и винограда.
2. Наиболее эффективные среди исследуемых ФП для плодовых субстратов с точки зрения увеличения выхода сока из сырья: для сливы и черной смородины – ферментный препарат *P. verruculosum* ВІ 7.4 (ФП ВІ 7.4), для рябины и выбранных сортов винограда - ферментный препарат *P. verruculosum* ВІ 7.7 (ФП ВІ 7.7). Определены оптимальные параметры ферментативной обработки для каждого из субстратов.

3. По разработанным технологическим схемам, включающим ферментативную обработку плодов и винограда, получены вина высокого качества, с более низкой вязкостью, меньшим содержанием летучих кислот, большей интенсивностью окраски.
4. Ферментативный гидролиз сброженных виноградных выжимок обеспечивает прирост сахаров в образцах, обработанных лабораторными ФП относительно образцов, обрабатываемых коммерческими ФП, а также обогащение полученных экстрактов галловой кислотой.
5. Лабораторный ФП ВІ 7.7, обеспечивающий эффективную биоконверсию полисахаридов большинства используемых в экспериментах плодов, обладает повышенным содержанием афлатоксинов, от которых удается полностью очистить препарат путем ультрафильтрации его растворов. Данный ФП по результатам испытаний отнесен к IV классу опасности (вещества малоопасные) по степени воздействия на организм согласно ГОСТ 12.1.007-76. Полулетальная доза ФП превысила 5 г/кг веса животного. Аллергизирующие свойства ФП не были выявлены.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы представлены в 10 публикациях, среди которых 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, тезисы и статья в четырех сборниках материалов конференций, патент. Основные положения и результаты работы были освещены на следующих научных конференциях и конкурсах: Международная научная конференция, посвященная 150-летию академика Вильямса, РГАУ ТСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 2013 г.; Весенний финал «У.М.Н.И.К.» МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 2013 г.; VII Международный научно-практический симпозиум «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов», ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии, Москва, 2014 г.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

ГЛАВА 1 ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА ФРУКТОВЫХ И ВИНОГРАДНЫХ ВИН

1.1 Основы технологии фруктовых вин

Фруктовые вина получают путем спиртового брожения сока или мякоти свежих плодов или ягод, а также из предварительно подброженной мякоти с добавлением спирта и сахара. Несмотря на то, что общие закономерности изготовления фруктовых вин схожи с принципами традиционного виноделия, фруктовые вина стоят особняком, и рынок их значительно менее развит.

В силу того, что многочисленные плоды и ягоды, используемые во фруктовом виноделии, имеют свои видовые особенности и содержат различное количество сахаров, кислот, фенольных соединений, пектинов и других важных в технологическом отношении компонентов, классификация таких вин сильно затруднена. Так, в международном Codex Alimentarius все фруктовые вина объединены в словосочетании «вина, получаемые не из винограда». Зачастую, фруктовым винам каждого типа присваивается определенное название, связывающее их либо с сырьем, из которого они получены, либо с их географическим происхождением. Применение стандартных технологических схем переработки для всех типов растительного сырья, используемого при получении фруктовых вин, по той же причине невозможно [1].

Не смотря на это, во многих странах традиционно изготавливают фруктовые вина, пользующиеся неизменным спросом. Самыми востребованными плодами для фруктового виноделия можно считать яблоки, сливу, грушу, вишню, но разнообразие плодов и ягод, применяемых в производстве алкогольных напитков, поистине огромно.

Применение сырья с различным химическим составом и потенциалом для фруктового виноделия влечет за собой существование определенных особенностей в технологическом процессе производства вин. Сравнительно низкое содержание сахара (от 6 до 19 %) в плодах и ягодах вынуждает использовать при брожении свекловичный сахар для достижения необходимой спиртуозности. Кислотность плодов и ягод колеблется в очень широких пределах (для груши 2-5 г/дм³, для черной смородины – до 40 г/дм³) [2], поэтому без использования технологических приемов, регулирующих кислотность (внесение лимонной кислоты, разбавление водой), далеко не из каждого вида сырья можно получить вина, содержащие оптимальное количество кислот [3]. Переработка плодов и ягод, богатых пектиновыми веществами, требует использования различных методик снижения вязкости сусла и облегчения сокоотдачи сырья. Как и процесс приготовления белых виноградных вин, получение фруктовых вин сопровождается тщательным контролем процессов окисления сусла в ходе ряда операций,

связанных с их изготовлением [4]. Следует также отметить, что производители фруктовых вин применяют расы дрожжей с характеристиками, отличными от дрожжей, используемых в традиционном виноградном виноделии.

Натуральные сладкие фруктовые вина получают путем сбраживания суслу с последующим порционным внесением сахарного сиропа. В этом случае брожение останавливается угнетением жизнедеятельности дрожжей повышением концентрации спирта в среде.

В целом, фруктовое виноделие складывается из тех же технологических операций, что и технология получения виноградных вин, рассмотренная ниже.

1.2 Основы технологии виноградных вин

Общая технология виноградных вин заключается в последовательности технологических стадий переработки винограда, а в дальнейшем – виноградного суслу с целью получения вин или виноматериалов, требующих дополнительной обработки перед розливом в бутылки. Сбраживанию виноградного суслу, главной стадии в процессе получения вина, всегда предшествуют гребнеотделение и дробление ягод винограда, часто аппаратно объединенные, получение мезги или суслу, а также их обработка. Технология виноделия подразумевает и такие операции, проводимые с сырьем и полупродуктами, как отделение суслу или виноматериала от твердых частей виноградной ягоды, фильтрация, сульфитация, оклейка, множественные переливки, эгализация, выдерживание виноматериалах в определенных условиях.

Определяющий фактор качества изготавливаемых вин – это, в первую очередь, используемый виноград. Именно качественные показатели винограда: его сахаристость, кислотность, содержание в ягодах красящих и ароматобразующих веществ, будут в дальнейшем определять возможность получения вин того или иного типа и стоимости [5]. Технических сортов винограда, традиционно применяемых в виноделии в России, множество, как интродуцированных, так и автохтонных. При этом вина различных регионов, изготовленные из одного сорта, всегда будут иметь особенности, обусловленные характеристикой местности, климатом, составом почв (терруар), а также применяемыми на виноградниках приемами возделывания винограда, технологическими особенностями его переработки. Все это делает возможным существование многообразного и изменчивого рынка вин, обладающих индивидуальными узнаваемыми качествами.

Классикой и фундаментом традиционного виноделия являются, без сомнения, столовые белые и красные вина, далее речь пойдет именно о них.

Особенности производства белых столовых вин. Белые столовые вина изготавливают из белых технических сортов винограда с хорошей сокоотдачей и сбалансированной

кислотностью, выраженным сортовым ароматом. Высококачественным считают вино, полученное с использованием одного сорта винограда с примесью других сортов не более 15 %. Для сухих вин предпочтительно собирать виноград с сахаристостью около 18-20 % и титруемой кислотностью 7-9 г/дм³.

Большинство белых столовых вин характеризуются желто-зелеными и соломенными оттенками цвета и нежным вкусом с отсутствием тонов окисленности и явной терпкости в послевкусии. В таких винах легко обнаруживаются недостатки, так как они не замаскированы избытком экстрактивных веществ или ярко выраженным, густым ароматом, типичными для насыщенных красных вин. В связи с этим для получения качественных белых вин необходимо особенно тщательно контролировать каждую стадию процесса производства, начиная от приемки сырья и его первичной переработки и заканчивая приемами обработки виноматериалов [6].

Переработку винограда для получения белых вин ведут в мягком механическом режиме, исключая раздавливание и измельчение гребней и косточек, а также перетирание кожицы винограда, что позволяет избежать в дальнейшем излишней грубости во вкусе конечного продукта. Время соприкосновения сусла и твердых фракций ягоды минимизируют, как и контакты сусла с воздухом в процессах переливок. Эти принципы работы необходимы для предохранения сусла от окисления кислородом и окислительными ферментами частиц взвесей, а также от перенасыщения сусла экстрактивными веществами. Тем не менее, нормативной документацией установлен нижний предел содержания экстракта в белых винах, который составляет 16 г/дм³. При недостаточном содержании экстракта обоснованно проводят мацерацию сусла на мезге, иногда прибегают к тепловой обработке мезги [7].

Оптимальная температура, поддерживаемая при брожении сусла белых сортов винограда, составляет от 14 до 18 °С, такой режим обеспечивает сохранение ароматических свойств сырья, предотвращает накопление избытка азотистых соединений, которые негативно влияют на устойчивость вин к помутнениям. По завершении брожения виноматериалы без задержек отделяют от дрожжевого осадка, не давая перейти в вино продуктам автолиза клеток дрожжей.

Кроме важного и обязательного принципа предохранения сусла и виноматериала для будущего белого столового вина от доступа воздуха, для уменьшения окислительно-восстановительного потенциала вина и получения малоокисленного продукта применяют диоксид серы (регулятор окислительно-восстановительных процессов), являющийся также и консервантом, предохраняющим сусло от микроорганизмов. Свободный SO₂ взаимодействует с перекисями и ингибирует окислительные ферменты (ОВ-ферменты), активность которых в сусле довольно высока. Диоксид серы имеет нормируемую предельно-допустимую

концентрацию в пищевых продуктах, безопасную для здоровья, и, как следствие, установленные границы концентрации в винах. В настоящее время от применения этого консерванта отказывается все больше производителей высококачественных, дорогих вин, переходя на технологические схемы, исключая внесение в продукт дополнительных компонентов.

Если говорить об отличии качества самотечной и прессовых фракций сусла с точки зрения их подверженности окисляемости, то самотечное сусло обладает меньшим содержанием окислительных ферментов, так как в основном они сосредоточены в кожце ягод. Для удаления излишних ОВ-ферментов из сусла белых сортов винограда часто применяют и дисперсные минералы, такие, как бентонит, которые абсорбируют на себе ферменты и делают возможным отделение их с осадком [8].

Особенности производства красных столовых вин. Технология получения красных вин (технология с контактом с твердыми частями виноградной ягоды) направлена на использование не только виноградного сока, но и различных соединений, значительная часть которых содержится в кожце и семечках винограда. В отдельных случаях, для получения насыщенных, терпких вин при настаивании сусла на мезге используют также и гребни. [9]. Вещества фенольной природы, переходящие в сусло из твердых частей ягоды, обеспечивают характерный для красных вин насыщенный цвет и полноту вкуса, а также являются составной частью окислительно-восстановительной системы вин, благодаря чему красные вина не так подвержены негативному влиянию кислорода, как белые. Продукты конденсации фенольных веществ ответственны за кирпичные и рубиновые тона зрелых, выдержанных красных вин, антоцианы – за глубокие, интенсивные сине-фиолетовые оттенки молодых вин. Энотанин и другие дубильные вещества из семян придают красным винам терпкость и сбалансированное общим экстрактом вяжущее послевкусие [10]. Окисляясь, фенольные вещества образуют хиноны, которые в дальнейшем вызывают окисление аминокислот и, как следствие, образование альдегидов, участвующих в формировании аромата красных вин, который непрерывно изменяется в процессе выдержки.

Для получения насыщенных красных вин используют сорта винограда, богатые антоцианами. На стабильность окраски влияет и значение рН; один из технологических приемов поддержания в винах с высоким значением рН интенсивности цвета – введение лимонной или винной кислоты [11].

Обогащение красных вин экстрактивными веществами из кожцы и семян ягод (антоцианами, дубильными веществами) обеспечивают, проводя сбраживание сусла на мезге, при этом значительная часть антоцианов уходит в дальнейшем с осадком, сорбируясь на мезге и клетках дрожжей, окисляясь, конденсируясь, взаимодействуя с белками. В вино переходит от

50 до 70 % всего запаса фенольных веществ, содержащихся в ягодах винограда, включая танин семян. Экстрагирование, в результате которого происходит извлечение из мезги фенольных и ароматических веществ, зависит от диффузионного сопротивления переносу вещества внутри частиц и интенсифицируется с повышением температуры. Для проведения экстракции брожение на мезге в определенных случаях заменяют настаиванием мезги с перемешиванием и нагреванием до 75 °С. К способам получения высокоэкстрактивных красных вин относят также обработку мезги ФП, брожение мезги в условиях повышенного давления CO₂, экстрагирование свежей мезги сброженным сусликом, брожение целых гроздей винограда [12,13].

Существуют различные способы обеспечения разливаемости красных виноматериалов, предотвращения выпадения в них осадка, сохранения цветовых характеристик вин. Обработка бентонитом влечет за собой удаление значительной части антоцианов, содержащихся в виноматериале; желатин удаляет продукты конденсации фенольных соединений, придающие вину коричневатый оттенок; обработка холодом вызывает осаждение нестойких фракций антоцианов, находящихся в коллоидном состоянии; пастеризация подобно горячему розливу в бутылки усиливает интенсивность цвета красных вин [14, 15].

Приемы, используемые для получения полусухих и полусладких столовых вин. Столовые вина с остаточным сахаром отличаются от сухих тем, что в них содержатся сахара (в количестве 4-18 г/дм³ для полусухих вин, 18-45 г/дм³ для полусладких и более 45 г/дм³ - для сладких вин). Такие вина изготавливают путем остановки брожения холодом (недоброды, содержащие остаточный сахар), либо купажируют сухой виноматериал сладким сусликом, полученным из того же винограда. Виноград в этом случае выбирают с высокой сахаристостью и низким содержанием азотистых соединений.

В винах с остаточным сахаром существует повышенный риск развития болезней, вызванных ростом различных микроорганизмов. По этой причине производство таких вин сопряжено с повышенным контролем, направленным на обеспечение их биологической стабильности. К методам стабилизации относят: бутылочную пастеризацию, горячий розлив, стерильный розлив, внесение диоксида серы и других консервантов [16].

1.3 Технологические проблемы, связанные с переработкой плодов и ягод. Методы их решения

Переработка плодов и ягод для получения соков, концентратов, морсов, традиционных и фруктовых вин сопряжена с рядом трудностей, обусловленных составом сырья и влиянием различных негативных факторов на полупродукты производства.

Необходимо, в первую очередь, решить такие проблемы технологии, как малый выход суслика из плодов, его затрудненное осветление и стабилизация [17]. Присутствие в

технологическом процессе стадий длительной мацерации мезги чреватو окислением субстрата, потерей его органолептических свойств и части полезных компонентов, множественные переливки опасны с точки зрения заражения мезги и сусла микроорганизмами [18]. Склонность изготавливаемых фруктовых и виноградных вин к различного рода помутнениям (биологическим, биохимическим, физико-химическим) объясняется наличием в продукте микроорганизмов; действием ОВ-ферментов на фенольные вещества в составе вин в присутствии кислорода воздуха; выпадением в осадок солей виннокислого калия и кальция; коагуляцией находящихся в коллоидном состоянии веществ (липидные, полисахаридные, белковые помутнения) и другими причинами.

При переработке плодов с высоким содержанием пектинов затруднены процессы прессования и фильтрации, что приводит к использованию больших количеств расходных материалов и замедлению ряда технологических процедур [19]. Для решения этих проблем используются методы дополнительной обработки плодов и ягод, которые способствовали бы сохранению или улучшению потребительских свойств вин.

Одним из востребованных методов такой обработки трудно-перерабатываемого сырья является его ферментативный гидролиз [20, 21, 22]. Разжижающие мультиферментные комплексы, используемые в виноделии, включают в себя, как правило, ферменты, гидролизующие каждый из основных полимеров растительной клетки плодового сырья и винограда [23, 24]. Применение полигалактуроназы и пектинэстеразы необходимо для получения легкофильтрующегося, прозрачного сусла с низкой вязкостью [25]. В то же время, действие мацерирующих ферментов, которые применяют в соковом производстве, может ограничиваться растворением срединной пластинки клеточной стенки, при этом растворимый пектин не подвергается глубокому гидролизу.

Ферментативная обработка сырья на различных этапах получения сусла увеличивает способность мезги к прессованию, повышает скорость фильтрования, сохраняет цвет, способствует извлечению аромата, снижению горечи, облегчению выпаривания при получении концентрированного сусла в случае такой необходимости [26, 27]. В процессе обработки тропических фруктов (мандаринов, манго, ананасов) ферментативную обработку также совмещают с микрофильтрацией через минеральную мембрану, что заметно повышает рентабельность производства осветленных соков из этих плодов [28]. Использование пектолитических ФП при переработке ряда плодов снижает мутность и вязкость сока, что способствует увеличению скорости потока при его последующей ультрафильтрации. Это связано с тем, что растворимый пектин, находящийся в коллоидном состоянии, способен закупоривать поры фильтрующей мембраны [29, 30]. Воздействие пектинлиазы совместно с пектинэстеразой обеспечивает увеличение выхода сока из богатого пектином сырья и

интенсифицирует его осветляемость [31, 32].

Для достижения наибольшей эффективности выделения из кожицы виноградной ягоды антоцианов, ароматических, дубильных веществ разрабатывают и применяют на практике методы фракционирования мезги с поэтапной обработкой ферментами разной специфичности. Такие методики довольно сложны, так как для каждого сорта винограда, выращенного в определенной местности характерны особенности толщины и плотности кожицы ягод, зависящие также от используемой техники работы с культурой винограда и климатических условий сезона, что неизбежно влечет за собой корректировку режимов обработки [33, 34]. Тем не менее, доказано, что обработка плодов ФП кроме разжижающего действия увеличивает концентрацию в соке антоцианов и влияет на его антиоксидантный потенциал [35, 36, 37].

Наряду с ферментативной обработкой плодов при получении вин используют и другие методы, помогающие избежать описанных ранее технологических проблем и получать качественные, стабильные вина. Среди таких методов можно выделить часто используемые тепловую обработку и воздействие на плодовую массу импульсного электрического поля (ИЭП). Если сравнивать между собой воздействие ИЭП, обработку ФП и термовинификацию с точки зрения эффективности извлечения фенольных веществ, то все методы ведут к увеличению общего количества антоцианов в готовом вине, при этом кинетические кривые накопления антоцианов несколько различны. Особенный интерес в данном случае представляет собой воздействие на мезгу ИЭП, так как этот метод позволяет увеличить в вине содержание антоцианов, влияющих на цветовые характеристики напитка, и общую концентрацию полифенолов, избежав введения в сырье добавок (против обработки ФП) и нагревания субстрата [38]. Обработка арбузного сока перед хранением высокоинтенсивным ИЭП разрешает проблемы биологической стойкости и инактивации ферментов, отрицательно влияющих на качество сока. ИЭП является в данном случае удачной альтернативой термической обработке. Арбузные соки, подвергнувшиеся воздействию ИЭП, после длительного хранения обладают лучшими физическими свойствами, такими, как цвет и вязкость, чем термически обработанные натуральные соки [39].

Для сохранения антоцианов вина применяют также холодную мацерацию перед началом брожения с использованием сухого льда, такой способ сохранения красящих веществ винограда позволяет получать вина с богатыми, яркими оттенками. Сохранение фенолов и антоцианов с помощью ферментативной обработки, о чем упоминалось выше, также возможно, но такие вина следует хранить в холодных погребах [40].

Стабилизирующие средства, применяемые в индустрии напитков из фруктов и ягод, включая винодельческую отрасль, и обеспечивающие их коллоидную и биологическую стойкость, разнообразны, кроме ферментов для этого используются антиоксиданты, сорбенты,

флокулянты [41]. Существует ряд классификаций этих средств, где они разделяются в зависимости от особенностей их применения, стадий технологического процесса, в которые они включены, и целей, преследуемых технологом, вводящим их в технологию производства напитков [42].

Для осветления уже полученного сула применяют как биологические добавки (каррагин, желатин, рыбий клей) [43], так и неорганические вещества (силикозоль, стабизоль), позволяющие добиться улучшения показателей осветленных напитков и интенсификации процессов фильтрации [44].

В заключение отметим, что среди многочисленных технологических приемов, цели которых сводятся к повышению выхода сока или сула с нужными свойствами из мезги и сохранению в нем ценных компонентов, ферментативная обработка является наиболее универсальным и широко применяемым. Ферментативный гидролиз сырья возможно совмещать с другими операциями, направленными на осветление и стабилизацию продукта, при этом повышается эффективность всего процесса переработки плодов. Ниже будет рассмотрен подробнее механизм ферментативного гидролиза растительных тканей, проанализировано использование ФП для получения соков из сырья различного состава и обсуждены перспективы применения ФП в винодельческой отрасли.

ГЛАВА 2 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ ПЛОДОВ И ЯГОД НА ПРИМЕРЕ ВИНОДЕЛЬЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ

2.1 Основы ферментативного гидролиза компонентов растительного сырья

2.1.1 Строение растительной клетки

Растительная клетка представляет собой сложную структуру, включающую в себя ансамбли различных полимерных соединений и низкомолекулярных веществ, при этом пропорции их в каждом структурном сегменте клетки зависят от ее функциональных задач и особенностей. Плодовая мякоть, служащая основным сырьем для винодельческой промышленности, состоит из клеток круглой или овальной формы, соединенных между собой межклетниками увеличенных размеров [45].

Растительная клетка покрыта тонкой оболочкой, внутри которой заключена протоплазма, выстилающая внутреннюю поверхность клетки и пронизывающая клетку насквозь [46]. Промышленная обработка растительной биомассы в той или иной степени всегда заключается в частичной деградации полимерной фракции клеток, в частности, весьма важное технологическое значение имеет разрушение клеточной стенки [47].

Основное вещество клеточной оболочки растения – матрикс, состоящий из гемицеллюлоз (глюкана, ксилана и других) и, в меньших количествах, из веществ пектиновой природы. В матрикс погружены микрофибриллы целлюлозы. Клеточные стенки высших растений, как правило, высокодифференцированы и помимо перечисленных высокомолекулярных компонентов содержат также белки и различные минеральные элементы [48].

Эффективно исполнять многочисленные функции клеточной стенке (формообразующие, регуляторные, защитные) позволяет ее строение. В большинстве тканей клеточная стенка состоит из первичной и вторичной оболочек, представляющих собой внешний и внутренний слои соответственно. Вторичная оболочка, в свою очередь, включает в себя внешний, средний и внутренний слои, для каждого из которых существует характерное взаиморасположение молекул структурных полисахаридов клетки [49]. Строение первичной стенки в различных растительных тканях весьма схоже и схематически изображено на рисунке 1.

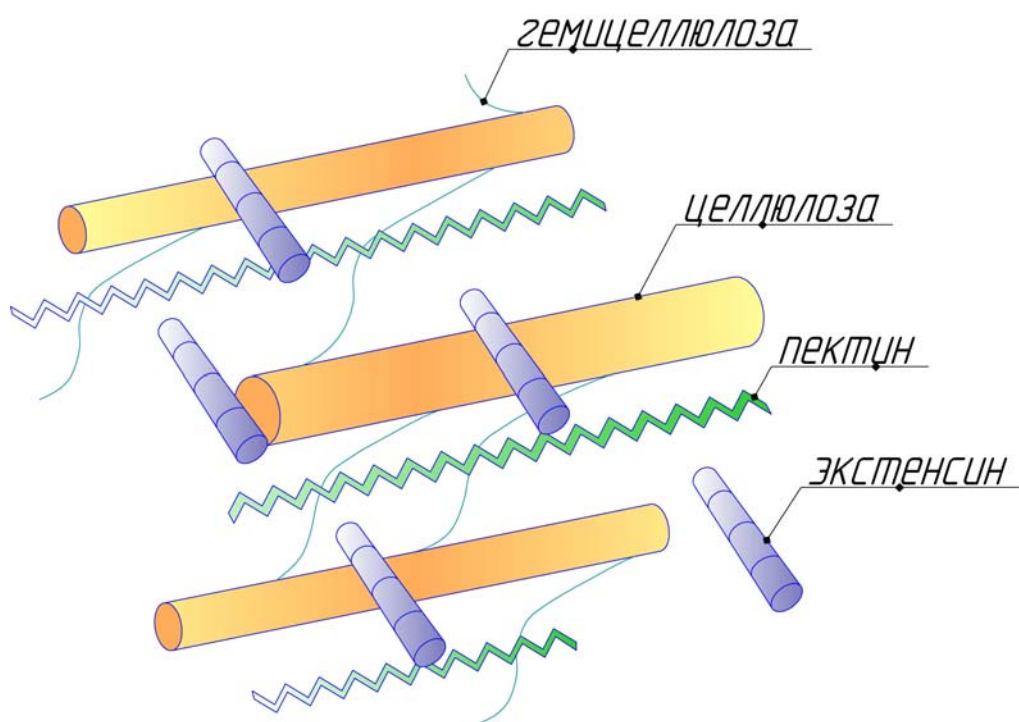


Рисунок 1 - Схема строения первичной стенки растительной клетки.

Структурный каркас первичной стенки составляют молекулы целлюлозы, собранные в микрофибриллы с помощью водородных связей. Каждая микрофибрилла целлюлозы покрыта мономолекулярным слоем ксиланов. Прочное взаимодействие между линейной частью ксиланов и микрофибриллами целлюлозы за счет водородных связей обусловлено схожестью их строения. Боковые цепи ксиланов направлены вовне, перпендикулярно микрофибриллам целлюлозы.

Ксилан также связан с пектином (рамногалактуронаном) через молекулы арабиногалактана, которые ковалентно присоединены одним концом к боковой цепи ксиланов, а другим – к рамнозильному остатку рамногалактуронана [50]. Каждая молекула рамногалактуронана связывается с различными молекулами арабиногалактана и ксиланов за счет своих рамнозильных остатков. Таким образом, с одной молекулой рамногалактуронана могут связываться молекулы ксиланов, фиксированные на различных микрофибриллах целлюлозы. Рамногалактуронан является цементирующим компонентом стенки и в то же время обеспечивает ее эластичность [51].

В процессе деления клеток возникает протопектиновая срединная пластинка, служащая основой первичной стенке. В первую очередь синтезируется полисахаридный гель (около 90 % первичной оболочки), затем происходит синтез целлюлозных фибрилл. По мере роста клетки происходит образование вторичной оболочки, в основном состоящей из целлюлозы.

Клеточная стенка соединена также с рядом гликопротеинов - белков, в состав которых входят моно- и олигосахариды. Гликопротеины либо ковалентно соединены с клеточной стенкой, закрепляя ее структуру, либо находятся в ней в растворенном состоянии, выполняя

биокаталитические функции. Большинство гликопротеинов клеточных стенок обогащены оксипролином. Высокий процент основных аминокислот в гликопротеинах позволяет им связывать отрицательно заряженные частицы или клетки, подобные бактериальным. Гликопротеин экстенсин (рисунок 1), состоящий на две трети из углеводов, связан с клеточной стенкой через изодитиозиновые мостики и формирует нерастворимый клеточный компонент [52].

Элементы растений, выполняющие каждый свою роль в обеспечении жизнедеятельности целого организма, сильно различаются по своему химическому составу. В межклетниках высших растений локализовано большое количество пектиновых веществ; мажорными элементами первичной оболочки являются арабаны и галактаны, целлюлоза, частично глюкоманнаны и пектиновые вещества; во вторичной оболочке преобладают целлюлоза, глюкоманнан и частично арабиноксиланы [53]. В меньших количествах в растительном сырье содержатся крахмал, белки, дубильные вещества, микро- и макроэлементы, витамины.

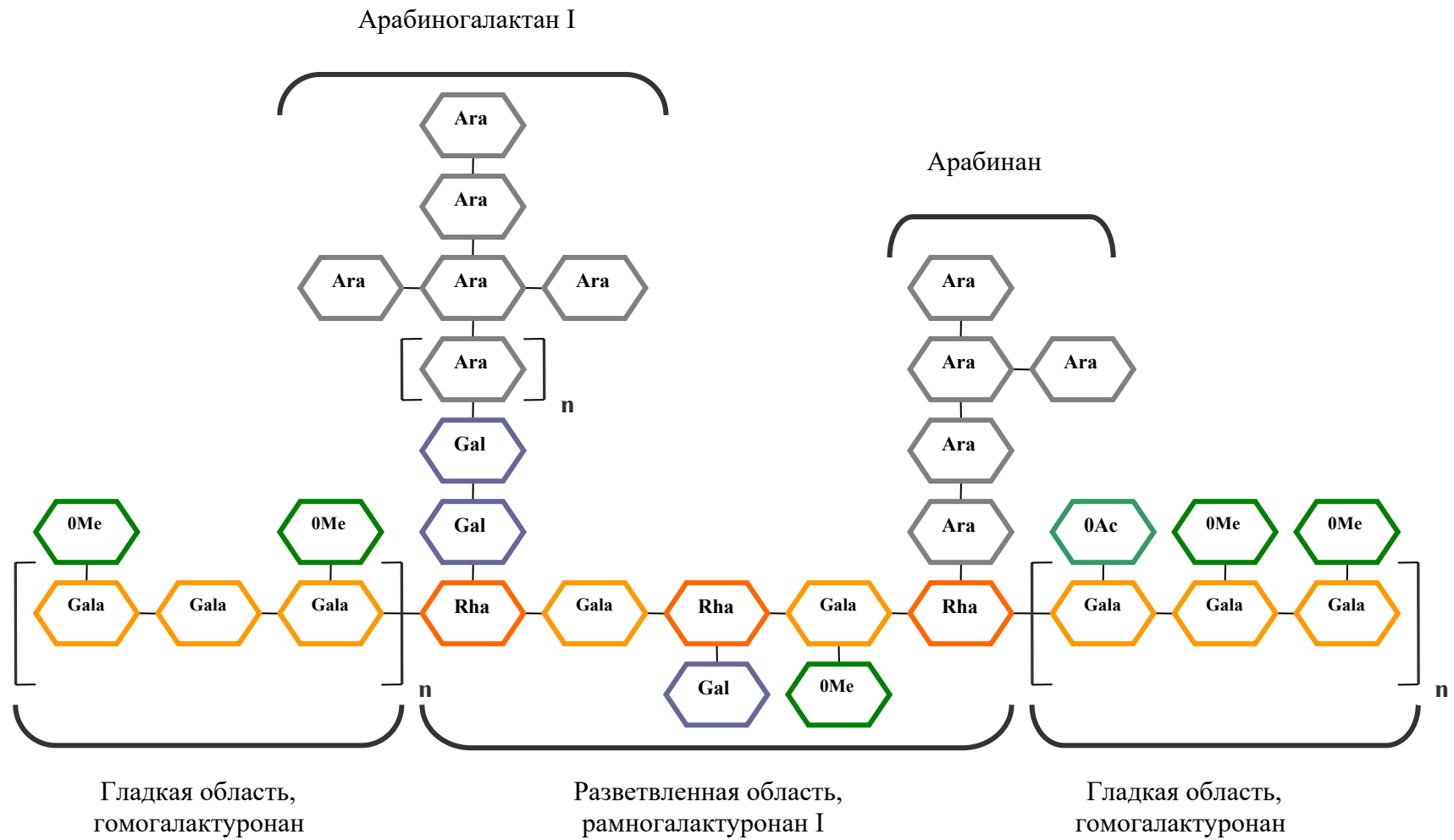
2.1.2. Химический состав сырья

Растительные клетки наряду с нерастворимыми полимерами содержат множество растворимых веществ, которые после переработки плодовой мякоти и получения из нее сока будут входить в его состав и определять его органолептические свойства. К этим веществам относятся лимонная, яблочная и другие органические кислоты, многоатомные спирты, красящие, дубильные, ароматобразующие вещества, витамины, низкомолекулярные сахара, жиры, неорганические соли. К группе нерастворимых веществ можно отнести целлюлозу, гемицеллюлозу, белки, крахмал, ксилан, ксилоглюкан, β -глюкан, протопектин.

Нерастворимые вещества при получении сока из свежего сырья простым прессованием находятся в твердой фракции. Ферментативный гидролиз высокомолекулярных нерастворимых компонентов сырья различного состава позволяет перейти им в растворимое состояние, что приводит к увеличению содержания экстрактивных веществ в соке и более полному использованию плодового сырья и винограда при получении насыщенных, специальный и столовых вин [54].

Пектиновые вещества. Пектин - важный структурный компонент, входит в состав всех растительных тканей. Текстура и плотность фруктов и овощей по мере их созревания, роста и хранения существенно зависят от содержания в них пектиновых веществ. Кроме того, что пектин выполняет скрепляющую функцию в структуре клеточной стенки, он также регулирует водный обмен растений, является промежуточным звеном в поглощении и транспорте ионов, участвует в механизмах защиты от патогенных организмов и при повреждении растения [55].

Пектиновые вещества содержатся в растениях в форме водорастворимого пектина, протопектина и кальций-магниевых солей пектиновой кислоты. Пектины из разных растительных источников схожи по строению: в их основной цепи различают гладкую (остатки α -1,4-D-галактуроновой кислоты) и разветвленную (вставки α -1,2-связанных остатков L-рамнопиранозы) области (рисунок 2). Часть карбоксиллов при C₆-атоме галактуроновой кислоты метоксилирована, степень метоксилирования колеблется от 30 до 90 % в зависимости от источника выделения пектина. В пектины входят также нейтральные полисахариды: арабинаны, галактаны, арабиногалактаны [56].



Gala – остаток D-галактуроновой кислоты

Gala-OMe – остаток метилового эфира D-галактуроновой кислоты

Gala-OAc – остаток ацелированной D-галактуроновой кислоты

Gal – остаток D-галактозы

Ara – остаток L-арабинозы

Rha – остаток L-рамнозы

Рисунок 2 - Структура пектиновых веществ [57].

Растительные пектины различаются по строению и свойствам в зависимости от источника и фазы развития растения, в целом они довольно лабильны и претерпевают ряд структурных изменений в процессе роста растительных тканей [58]. В связи с этим, говоря о веществах пектиновой природы, часто используют ряд терминов, с помощью которых можно наиболее ясно описать те или иные механизмы, функционирующие в клетках растений:

- протопектин – нерастворимый в воде полимер, в состав которого входят частично метоксилированный галактуронан и нейтральные полисахариды;
- растворимый пектин – метоксилированный полимер галактуроновой кислоты, растворимый в воде (различают высокоэтерифицированный, свыше 50 % метоксилирования, и низкоэтерифицированный, до 50 % метоксилирования, пектин);
- пектиновая кислота – низкоэтерифицированная полигалактуроновая кислота;
- пектинаты и пектаты – соли пектиновой и пектовой кислот.

Чем выше степень этерификации пектиновых молекул, тем выше вязкость их растворов. Низкоэтерифицированные пектины плохо растворимы, так как ассоциируют друг с другом за счет водородных связей. Высокоэтерифицированные пектины хорошо растворимы в воде и пластичны [59].

Кислая среда раствора влияет на степень диссоциации свободных карбоксилос галактуроновой кислоты в составе пектина, вследствие чего силы отталкивания в пределах одной молекулы уменьшаются, и она скручивается в спираль. Наиболее спирализованы высокоэтерифицированные пектины.

Сахара (глюкоза, фруктоза, сахароза) способны создавать с пектиновыми веществами гели, что значительно увеличивает вязкость пектиновых растворов.

В свежих плодах и ягодах пектин составляет 0,5-2,5 % сырой массы, вместе с ростом плодов увеличивается и содержание в них пектиновых веществ. Присутствие пектина в соке нежелательно, так как он создает условия, затрудняющие процессы прессования плодовой мякоти, а также фильтрации и осветления соков и вин. Даже незначительное его количество может привести к образованию в соке мути, а в процессе брожения - к появлению сложноотделимого рыхлого осадка, что впоследствии повлечет за собой ряд технологических проблем [60].

Нейтральные полисахариды. Целлюлоза – самый распространенный полисахарид на планете, входит в состав всех растительных тканей, ее содержание в плодах и ягодах в среднем колеблется от 0,3 до 5,1 %. Этот линейный полимер состоит из остатков глюкозы, связанных β -1,4-гликозидными связями. В клеточных стенках молекулы целлюлозы образуют фибриллы, сближаясь друг с другом с помощью водородных связей [61]. В фибриллах имеют место как плотно упакованные участки с кристаллической структурой, так и паракристаллические

области. Кристаллические участки наиболее устойчивы к воздействию гидролизующих ферментов (гидролаз), так как их плотная упаковка не предполагает наличия воды в межмолекулярном пространстве. Рыхлые и концевые аморфные участки молекул целлюлозы гидролизуются достаточно легко. Соотношение легко- и трудногидролизующих участков в фибриллах целлюлозы зависит от источника ее выделения [62].

Гемицеллюлозы – группа полимерных соединений, как и целлюлоза, представители гемицеллюлоз содержатся в тканях всех известных растений. В плодах и ягодах содержится 0,1-0,6 % гемицеллюлоз различного состава. Молекулы этой группы полимеров состоят из таких простых сахаров, как глюкоза, галактоза, ксилоза, арабиноза, манноза.

Одни представители гемицеллюлоз (β -глюкан, галактан) являются гомополисахаридами, другие – гетерополисахаридами и содержат различные мономерные звенья (арабиноксилан, ксилоглюкан). Большинство гемицеллюлоз имеют нерегулярное строение, содержат различные разветвленные участки [63]. Увеличение степени ветвления всегда говорит о лучшей растворимости соединений этой группы [64].

Крахмал – запасной полисахарид растений, мономерным звеном которого является глюкоза. В растительных тканях крахмал представляет собой смесь двух видов полимеров: амилозы (линейный полисахарид, остатки глюкозы соединены α -1,4-гликозидными связями) и амилопектина (разветвленный полимер, в точках ветвления остатки глюкозы соединены α -1,6-гликозидными связями). В плодах и ягодах, пригодных для виноделия, содержание крахмала не превышает 0,8 %. К запасным полисахаридам, встречающимся в клетках растений, относятся также инулин и галактоманнан [65, 66].

Исчерпывающий гидролиз растительного сырья обеспечивает накопление в гидролизатах смеси простых сахаров: глюкозы, фруктозы, галактозы и других. В процессах гидролиза плодов и ягод деструкции подвержены также и дисахариды, среди них стоит выделить целлобиозу, мальтозу, сахарозу, лактозу.

2.1.3 Ферменты, участвующие в биоконверсии компонентов растительного сырья

Гидролиз высокомолекулярных компонентов растительного сырья можно осуществить, используя один или несколько ферментов в зависимости от особенностей строения гидролизующего полимера и от заданной степени расщепления. Для частичного гидролиза, продуктами которого являются фрагменты нативного субстрата, как правило, используют ферменты эндо-деполимеразного типа, полный гидролиз проводят с помощью комплекса эндо- и экзо-деполимераз, внося их в массу гидролизующего сырья одновременно или последовательно [67, 68].

Ниже представлены ферменты, необходимые для эффективной биоконверсии полимеров плодов и ягод, с их краткими характеристиками. Особое внимание уделено действию ферментов пектолитического комплекса, так как субстрат, на который они воздействуют, наиболее сильно влияет на затрудненность и замедленное проведение ряда технологических операций в процессах получения соков и вин [69].

Пектолитические ферменты. В зависимости от механизма воздействия на субстрат пектолитические ферменты принято делить на две подгруппы: ферменты, расщепляющие пектиновые вещества с участием воды (гидролитические), и негидролитические ферменты, принадлежащие к классу лиаз (таблица 1). Расщепление пектиновых веществ лиазами идет путем трансэлиминирования с образованием двойной связи в продуктах реакции. Пектолитические ферменты подразделяются также на эндо- и экзо-деполимеразы [70].

Таблица 1 - Классификация пектолитических ферментов.

| Действие | Фермент |
|--|--|
| Расщепление пектина с высокой степенью этерификации (трансэлиминирование) | Пектинлиаза (ПЕЛ) Эндо-ПЕЛ |
| Расщепление пектина с низкой степенью этерификации (от 20 до 40%) (трансэлиминирование) | Пектатлиаза |
| Отщепление метоксильных групп (гидролитическое расщепление) | Пектинэстераза |
| Расщепление низкоэтерифицированных пектинов и полигалактуроновой кислоты (гидролитическое расщепление) | Полигалактуроноза (ПГ) Эндо-ПГ Экзо-ПГ |

Под действием пектинлиазы путем трансэлиминирования протон из 5-атома углерода переносится в кислород гликозидной группы, причем одновременно происходит расщепление этого α -1,4-гликозидного соединения [71]. Пектатлиаза также действует по механизму трансэлиминирования, но проявляет наибольшую активность при расщеплении пектина с низкой степенью этерификации. При расщеплении пектина с помощью пектинлиазы или пектатлиазы метанол не освобождается.

Пектинэстераза расщепляет этерифицированные карбоксильные группы пектина с участием молекул воды, освобождая метанол. Этот фермент специфичен по отношению к метоксильным группам, не затрагивая другие сложные эфиры.

Полигалактуроноза осуществляет гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных соединений пектиновой кислоты. Оптимальное значение рН для функционирования пектинэстераз и полигалактуроназ из разных источников (растений, микроскопических грибов или бактерий) колеблется в весьма широких пределах (от 4,5 до 8,0). Наиболее активные продуценты пектолитических ферментов относятся к роду *Aspergillus* [72].

Гемицеллюлазные ферменты. Ферменты, осуществляющие деполимеризацию гемицеллюлоз (глюканов, пентозанов), относятся к классу гидролаз. Их делят на три группы: β -глюканазы, β -ксилаказы, β -глюкозидазы.

Ферменты, относящиеся к группе β -глюканаз катализируют расщепление β -глюканов с β -1,2-, β -1,3-, β -1,4-, β -1,6-связями. Это кислые белки, в составе которых присутствуют углеводные фрагменты (остатки маннозы, галактозы, глюкозы). β -Ксилаказы воздействуют на β -гликозидные связи в β -ксиланах по эндо- и экзо-деполимеразному механизмам. β -Глюкозидазы являются ферментами экзо-деполимеразного действия, атакующими β -1,4-связь с нередуцирующего конца полимерной цепи β -D-глюкозидов (продукт реакции – β -D-глюкоза). Для данной группы ферментов характерна широкая субстратная специфичность, их воздействию подвержены также β -D-галактозиды, β -L-арабинозиды, β -D-ксилозиды.

Гемицеллюлазные ферментативные комплексы получают путем культивирования различных видов микроорганизмов – продуцентов целевых ферментов, чаще всего используют *Trichoderma viride*, *A. awamory*, *A. foetidus*, *Trichothecium roseum*.

Продукты частичного гидролиза гемицеллюлоз, гумми-вещества, растворимы в воде и образуют вязкие растворы, влияя на процессы прессования, осветления и фильтрации фруктовых и ягодных соков, в том числе при производстве специальных вин [73].

Целлюлолитические ферменты. Ферменты целлюлолитического комплекса (эндо-глюканазы, целлобиогидролазы) воздействуют на целлюлозу и продукты ее частичной деградации. Важное свойство целлюлаз заключается в их способности сорбироваться на природной целлюлозе [74].

Эндо-1,4- β -глюканазы (ЭГ) гидролизуют внутренние β -1,4-гликозидные связи целлюлозы, действуя в большей степени на аморфные участки полимерной цепи. В результате такого воздействия образуются крупные олигосахариды, что влечет за собой резкое уменьшение степени полимеризации субстрата. Существуют ЭГ, деполимеризующие целлюлозу с одновременным отщеплением от цепи моно- и дисахаридов. Целлобиогидролазы (ЦБГ), в свою очередь, обладают способностью гидролизовать как аморфную, так и кристаллическую целлюлозу, отщепляя остатки целлобиозы с конца полимерных молекул, действуя также и на частично гидролизованный субстрат.

Эффективными продуцентами целлюлаз являются многие микроскопические грибы, наиболее известным и широко используемым из которых является микроскопический гриб *T. reesei* [75].

Амилолитические ферменты. Амилолитические ферменты гидролизуют крахмал, к ним относятся α - и β -амилазы, глюкоамилаза и др. α -Амилаза является эндо-деполимеразой, расщепляющим α -1,4-гликозидные связи внутри полимерной цепи субстрата с образованием

продуктов разной степени полимеризации (декстринов). β -Амилаза и глюкоамилаза – экзо-деполимеразы, действующие на субстрат с нередуцирующего конца. β -амилаза действует на линейные участки цепи амилозы и амилопектина (на α -1,4-гликозидные связи), отщепляя мальтозу. Глюкоамилаза отщепляет от полимера α -D-глюкозу и способна действовать также на α -1,6-связи в местах ветвления амилопектина.

При переработке крахмалсодержащего плодово-ягодного сырья следует, в первую очередь, обращать внимание на присутствие в используемом мультиферментном комплексе α -амилазы и глюкоамилазы. Продуцентами α -амилаз, как правило, являются бактерии рода *Bacillus*, глюкоамилаз – грибы рода *Aspergillus*.

2.2 Опыт использования ферментных препаратов в виноградном и фруктовом виноделии

Применение ФП при производстве вин и соковых напитков осуществляется с целью повышения выхода сока, осветления и стабилизации соков и вин, увеличения содержания экстрактивных веществ, предотвращения окислительных процессов в соках и изготавливаемых из них продуктах, а также для инверсии сахарозы при производстве безалкогольных напитков и сиропов. Выбор ферментов для гидролиза сырья определяется поставленной целью (степень гидролиза, конечный продукт и др.), свойствами и составом сырья, параметрами процесса. Допускается использование как коммерческих ФП, так и ферментов самого сырья [76].

Подбор ФП для винодельческой отрасли ограничен уровнем их устойчивости к низкому значению рН, способностью функционировать при низкой температуре и в присутствии этилового спирта в среде. Для получения вин с высоким ароматическим потенциалом в ряде работ используются микробные β -глюкозидазы (*Aureobasidium pullulans*) [77]. Обработка сусла на всех стадиях брожения с помощью ФП, содержащих устойчивую к повышенным температурам и присутствию в среде сахаров и этанола β -глюкозидазу, позволила реализовать способ получения легкоосветляемого сусла с богатым составом ароматобразующих компонентов [78].

Пектинлиаза, полученная на основе *Geobacillus stearothermophilus*, имеет оптимумы рН и температуры не совместимые с производством вин, но вполне удовлетворительные для эффективного использования этого фермента в производстве фруктовых соков [79]. Так как пектиназы и другие востребованные в винодельческой промышленности ферменты из мезофильных и термофильных микроорганизмов не обладают высокой активностью при низких температурах, ведется активный поиск новых, активных при низких температурах ферментов и их продуцентов, которые проявляли бы максимум своей активности в условиях технологического процесса получения качественного сусла [80].

Общий рост уровня потребления напитков на основе плодов и ягод сопровождается появлением на рынке продуктов из экзотических фруктов, ранее не используемых в отрасли ввиду высокой плотности их мякоти и, как следствие, проблем, возникающих при их переработке. Примеры использования нетрадиционного сырья наиболее ярко отражают возможность влияния ФП на протекание процессов получения соков или сусла [81]. Пектиназные ФП позволяют решать проблемы переработки такого сырья с высокой эффективностью, делая выделяемый сок прозрачным за счет разрушения пектина и интенсификации седиментационных процессов, а также положительно влияя на стабильность сока и его органолептические качества [82]. Фруктовый сок из экзотической для России красной питайи возможно обогатить белком и витамином С, используя стадию ферментативного гидролиза мякоти питайи пектиназами. Такие результаты могут быть полезны при исследовании возможности получения функционального питания на основе этого фрукта [83]. При обработке коммерческими ФП (Pectinex, Cellubrix) фиников, которые являются источником сахара в Иране, удастся увеличить выход экстрагируемого продукта на 40 % при воздействии смеси этих препаратов [84]. Многократная ферментативная обработка плодовой мякоти иммобилизованными на твердом носителе ФП провоцирует значительное снижение вязкости сока [85].

Экзотические фрукты все чаще используются в виноделии, а такой прием предобработки сырья, как ферментативный гидролиз, предшествующий сбраживанию сусла, позволяет развивать новые технологии и приводит к диверсификации рынка, что положительно сказывается на общей экономике отрасли [86, 87]. Существуют работы, говорящие о перспективе использования ФП, содержащих пектиназы и α -L-рамнозидазу, обработка которыми различных плодов, являющихся сырьем при изготовлении фруктовых вин, может исключить присутствие горечи во вкусе готового продукта [88, 89]. В экспериментах по подбору ФП для снижения мутности в винах из такого нетрадиционного для этой отрасли сырья, как банан, хорошие результаты показали ФП, содержащие в своем составе целлюлазы, эффективность такой обработки возростала при внесении протеиназ, влияющих на белковые помутнения [90].

Как во фруктовом, так и в традиционном виноделии ферментативная обработка экономически выгодна, так как значительно увеличивает выход сусла, особенно высококачественных самотечных фракций, ускоряет сокоотдачу, улучшает процесс осветления и фильтрации сусла и в итоге сокращает продолжительность технологического цикла переработки сырья. Обработка мякоти красного винограда сорта Вранац, распространенного в Восточной Европе, коммерческими пектиназными ФП (Vinozym, Rohapect, Trenolin) привела к

увеличению выхода сусла на 5-6 % по отношению к пробам, не прошедшим обработку ферментами [91] после 6-часовой обработки при дозировке ФП 200 мг/кг мезги.

Вина, полученные из обработанного ферментами сусла и мезги, обладают высокими вкусовыми качествами, отличаются хорошими внешними данными, чистым сортовым ароматом. Созревание их протекает быстрее, вследствие этого они требуют более раннего розлива [92].

Ферментативная предобработка фруктовой биомассы позволяет достигать более полной экстракции антоциановых соединений. Благодаря обработке ферментами (ФП пектолитического и гемицеллюлазного действия) ягод красной рябины на составе получаемого из нее сусла была обнаружена новая разновидность антоцианов (цианидин-3-софорозид), которой без применения ФП выявлено не было [93].

Исследования преимуществ реализации технологий, направленных на изменение цветовых и ароматических характеристик вин с помощью ферментативной обработки мезги, показали, что полученные результаты очень сильно зависят от свойств конкретного сорта обрабатываемого винограда, одни и те же ФП могут заметно влиять на цвет получаемого вина в одном случае и проявлять новые ароматические свойства вин – в другом, при этом практически не влияя на окраску получаемого вина [94]. Данные экспериментов, в которых среди других принимали участие коммерческие ФП Endozym и Derpectil свидетельствуют о том, что ферментативная обработка красных сортов винограда может положительно влиять на цветовые характеристики вин, но использование ферментов исключительно для этой цели нецелесообразно. В работе [95] показано, что если сравнивать между собой применение холодной мацерации и ферментативный гидролиз для сохранения в винах антоцианов, то первый метод предпочтительнее, несмотря на то, что ферментативная обработка позволяет извлекать проантоцианидины не только из кожицы, но и из семян винограда. Такие результаты говорят о возможности применения ферментов для лучшей экстракции красящих соединений в технологиях выделения натуральных красителей [96, 97].

На содержание в винах олигосахаридов сильное влияние оказывает климат и состав почв в местности, где был выращен виноград, значение этого показателя в сладком сусле можно сгладить применением на стадии переработки мезги пектиназными ФП [98], содержащими β -галактозидазу, что в последствии облегчит эгализацию вин [99, 100].

2.3 Ферментативная обработка плодового сырья различного состава. Преимущества использования комплексных ферментных препаратов

Основной процесс, протекающий при ферментативной обработке плодово-ягодного сырья представляет собой гидролиз полимеров сырья, в частности, пектиновых веществ [101].

Но наряду с превращениями пектиновых веществ изменения претерпевают целлюлоза, гемицеллюлозы, белковые вещества и ряд других соединений. Воздействие ферментов на мезгу приводит к полному нарушению первичного состояния ткани, благодаря чему удается снизить риск образования помутнений, увеличить выход сока и морсов, повысить их органолептические показатели и стойкость напитков при хранении [102].

Применяя ФП, необходимо руководствоваться требованиями, предъявляемыми технологией получения конкретного продукта из определенного типа сырья, как по типу катализируемой реакции, так и по условиям действия ферментов (рН, температура, концентрация субстрата, продолжительность обработки и т.д.). Для выбора ФП необходимо среди прочего установить, какие превращения он должен осуществлять и на какие вещества он не должен действовать.

Наиболее эффективными для применения в отрасли пищевой промышленности, связанной с переработкой плодов и ягод, являются комплексные ферментные композиции, осуществляющие деградацию клеточной стенки растения и содержащие целлюлолитические, гемицеллюлитические и пектолитические ферменты. В связи с этим при действии одного или группы основных ферментов неизбежно действие и сопутствующих, которые могут негативно повлиять на качество получаемого продукта. Один и тот же ФП, как правило, нельзя применять при переработке различных плодов и ягод с целью получения разных целевых продуктов.

Выбор ферментного комплекса для определенного вида сырья регулируется химическим составом последнего, иными словами, чтобы добиться максимально глубокой и эффективной биоконверсии определенного вида сырья, сочетание ферментативных активностей в ферментном комплексе должно соответствовать особенностям состава используемого сырья и обладать свойствами, совместимыми с определенными стадиями производственного цикла.

Перерабатываемое плодово-ягодное сырье по технологическим параметрам можно условно разделить на четыре группы:

1. Плоды, имеющие плотную ткань при технической незрелости (яблоки, груши и т.д.). При их обработке пектиназами ФП, основными компонентами которых являются эндополигалактуроназа и пектинэстераза, гидролизуются водорастворимые пектиновые вещества, вследствие этого снижается вязкость сока. Так, выделенные из гриба *A. niger* пектиназы показали способность эффективно воздействовать на яблоки и чернику с точки зрения снижения вязкости и мутности субстрата, а также сохранения его антиоксидантного потенциала [103]. При переработке яблок оптимально сочетание эндо-полигалактуроназ, целлюлаз и кислой протеазы.

В то же время ананас относится к плодам, содержание ксилана и гемицеллюлоз в которых превосходит содержание пектина. Для успешного проведения ферментативной

обработки биомассы плодов ананаса следует использовать ксиланазу совместно с пектиназами и целлюлазами. Результативность такого принципа обработки ананаса была подтверждена экспериментально [104].

2. Плоды и ягоды, имеющие тонкую покровную и рыхлую основную ткань (малина, земляника, клубника, ежевика, смородина). Затруднение в извлечении сока плодов и ягод этой группы связано с их низкими дренажными свойствами. Под действием пектолитических ФП ткань и большинство клеток ягод разрушается, клеточная проницаемость возрастает, следовательно, возрастает и выход сока.

В качестве примера можно привести высокоэффективный гидролиз гуавы, который удалось осуществить ферментативным комплексом, содержащим пектиназы, целлюлазы и гемицеллюлазы (в котором преобладали пектолитические активности) [105]. При обработке карамболы также большое значение имеет содержание пектиназ в составе ферментных препаратов, применяемых с целью глубокой деградации клеточных полимеров растения [106].

3. Культуры, при повреждении кожицы плодов которых мякоть превращается в мезгу жидкой консистенции (виноград, клубника). Значительная часть сока плодов и ягод этой группы растений при измельчении отделяется без применения прессования. При жестких режимах механической переработки сок легко отделяется, но в большинстве случаев его качество низкое. Поэтому для красных плодов желательно обеспечить распад как основной, так и покровной тканей для максимального извлечения красящих и ароматических веществ. Необходимым условием является и снижение вязкости сока. Следует отметить увеличение экстрагирования полифенолов из кожицы виноградных ягод в процессе их мацерации в присутствии пектолитических ФП [107].

4. Косточковые культуры (сливовые, кизил). В недозрелом состоянии эта группа растительного сырья имеет плотную ткань, что является препятствием для извлечения сока. В процессе созревания ткань этой группы плодов размягчается и становится пюреобразной, выделение сока из такой ткани прессованием практически невозможно. Действие пектолитических ферментов в данном случае приводит к увеличению клеточной проницаемости за счет гидролиза пектина и протопектина. Вязкость сока при этом снижается, а его выход – увеличивается. При получении сока из сливы, абрикосов, клубники, вишни, малины, черной смородины успешно применяют ФП, расщепляющие пектин и нейтральные полисахариды [108, 109].

Ферментные композиции, составленные из индивидуальных выделенных и очищенных ферментов из различных источников, главным образом, микроскопических грибов, довольно дороги в связи с особенностями их производства. Все большее внимание исследователей привлекает возможность использования комплексов ферментов в наиболее выгодных

пропорциях друг относительно друга на основе одного штамма микроорганизма, модифицированного с помощью методов геной инженерии [110, 111, 112]. Разжижающие ферментные комплексы, выделенные из таких мицелиальных грибов, являются объектом обширного ряда исследований, что обусловлено их характеристиками и достоинствами технологии их получения [113].

Спрос на такие ферментные комплексы все больше растет, и, благодаря этому, проводятся исследования, направленные на оптимизацию процессов их производства и использования в различных технологиях, позволяющих сделать их более эффективными и экологичными. ФП, обладающие пектинлиазной и другими видами пектолитических активностей, как следует из примеров, приведенных выше, актуальны для различных биотехнологических направлений; особенно большим спросом пользуются стабильные и высокоактивные комплексы. Основными продуцентами ФП с подобными характеристиками являются микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* [114]. Несмотря на определенный прогресс в данной области, разработка новых ферментных систем по-прежнему актуальна, так как их появление обещает снижение затрат на изготовление ферментов, наиболее эффективное использование сырья, снижение временных интервалов технологических стадий переработки плодов и ягод, улучшение характеристик готовой продукции.

Несомненно, пектиназы играют важнейшую роль в биоконверсии полисахаридов плодового сырья [115]. Изучение каждого из ферментов, участвующих в деградации пектина, с точки зрения их источников, регуляторных путей, биохимических свойств, необходимы для выработки стратегии производства специфических ферментных композиций. Такие знания позволят создать низкзатратные технологии, связанные с деградацией растительных биополимеров при максимальном контроле процессов их расщепления [116].

2.4 Возможности применения ферментов при переработке отходов плодового сырья и винограда

Накопление производственных отходов не только негативно сказывается на экологической обстановке, но и порождает необходимость использования этих отходов в качестве дополнительных сырьевых ресурсов, так как в ходе технологического процесса в эти продукты переходит определенное количество ценных компонентов, содержащихся в исходном сырье. Утилизируемая твердая фракция плодовой мезги может стать источником пищевых волокон, красящих веществ, витаминов, минеральных веществ. По этой причине разработка эффективных способов комплексной переработки растительного сырья, включающей и вторичную переработку промышленных отходов, на базе которых возможно получение

дополнительных продуктов, в настоящее время весьма актуальна.

Обобщенная модель комплексной переработки различных видов сочного плодово-ягодного сырья представлена на рисунке 3.

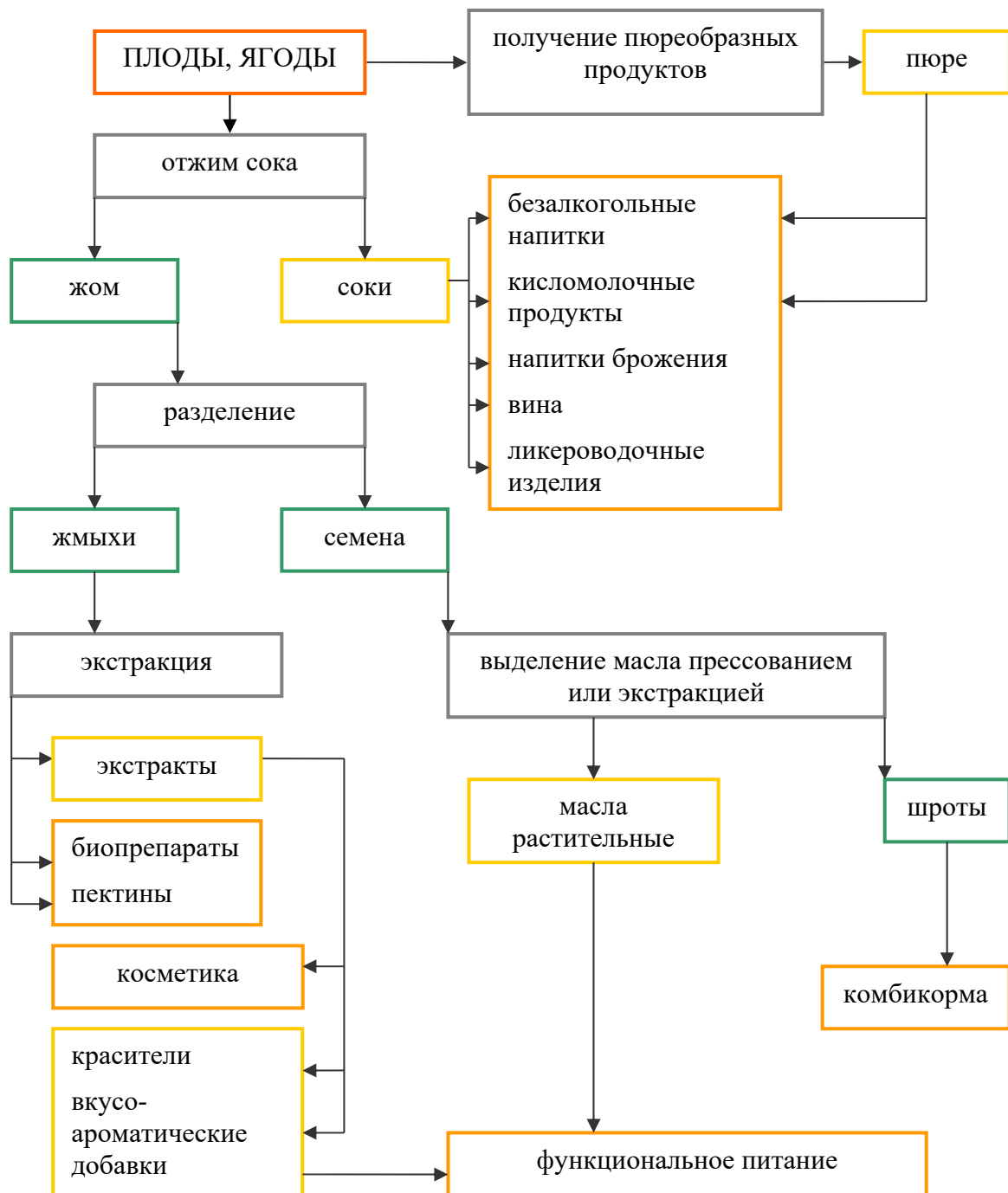


Рисунок 3 - Общая схема комплексной переработки плодово-ягодного сырья.

Мякоть сочного плодового или ягодного сырья используется для получения пюре, соков, виноматериалов, поэтому жмыхи и шроты являются источниками как пищевых волокон, так и экстрактов, насыщенных различными ценными веществами [117, 118, 119], а семена могут использоваться в качестве сырья для получения ценных растительных масел, содержащих жирные кислоты и витамины [120].

Для рационального использования сырья необходимо исследование его химического состава, пищевой ценности, технологических и физиологических функциональных свойств продуктов переработки этого сырья. Применение комплексного подхода при переработке мезги и выжимок из фруктов и ягод позволяет уменьшить количество остающихся отходов, снизить экологическую нагрузку на территорию предприятий и регионов, в пределах которых они функционируют, расширить ассортимент вырабатываемой на предприятиях продукции. Реализация прогрессивных промышленных технологий переработки растительного сырья в некоторой степени решает, кроме того, важную задачу по обеспечению продовольственной безопасности и удовлетворения растущей потребности населения в разнообразных и качественных продуктах питания [121].

Одним из востребованных направлений комплексной переработки сырья соковой и винодельческой промышленности является получение на основе плодовых и виноградных выжимок натуральных красителей и ароматизаторов. Цвет и аромат, являющиеся важнейшими атрибутами, характеризующими качество пищевого продукта, влияют на его конкурентоспособность на рынке. Следствие этого факта – повышенный неослабевающий спрос на природные ароматизаторы и красители. В настоящее время используются разнообразные методики выделения натуральных ароматических соединений и красящих веществ из растительного сырья: экстракции, перегонки с водяным паром и т.д.

Ферментативная обработка плодов и ягод позволяет существенно увеличить производство и расширить ассортимент пищевых продуктов, повысить их качество и биологическую ценность. Это дает возможность существования технологий, основанных на применении ферментов при обработке плодовых или ягодных выжимок (винограда, свеклы, черноплодной рябины, цедры цитрусовых и др.), направленных, в том числе, на производство на основе этих отходов натуральных красящих веществ.

Для того, чтобы наиболее эффективно проводить деструкцию целостного растительного материала, используют различные комбинации ферментов, способствующие повышению извлечения желаемых вкусовых и цветовых компонентов растительной биомассы. Выбор правильного типа ферментов и условий их применения для обработки плодово-ягодных субстратов необходимы для их эффективного использования в процессах экстракции тех или иных целевых продуктов. Для извлечения ароматических и цветовых компонентов используют комбинации целлюлаз, гемицеллюлаз, пектиназ. Неоспоримые преимущества ферментативной экстракции – сокращение временных затрат, минимальное использование растворителей, повышение выхода продукта с улучшенными качественными показателями. Разнообразие ферментов обеспечивает продовольственную отрасль широким набором функциональных возможностей. Комплексные ФП, полученные с использованием методов геной инженерии,

могут быть весьма эффективны, так как их промышленное производство требует меньших затрат [122].

Известны работы, в которых для выделения из плодов красящих компонентов использовались ФП, обладающие β -глюканазной, целлюлазной, ксиланазной и пектолитической активностью [123, 124]. Интересные данные были получены при оценке возможности получения красителей из твердой фракции моркови и черной смородины проведением ферментативного гидролиза с помощью ФП ВискоСтар 150 L, включающего гемицеллюлазы и целлюлазы [125]. Экстракты из виноградных косточек и виноградных выжимок являются источником полифенолов. Экстракты, полученные путем воздействия на субстрат пектиназ совместно с танназами, содержат смесь полифенолов и сахаров и обладают антиоксидантной активностью [126, 127].

Из неостребованной фракции биомассы (технологических отходов) методом ферментативной обработки возможно получать пектины и пектиновые олигосахариды [128]. Свекловичный жом используют подобным образом в качестве сырья для получения нейтральных и кислых олигосахаридов с использованием смеси целлюлаз и пектиназ [129, 130].

Отходы растительного сырья могут служить основой или дополнительным компонентом среды для культивирования микроорганизмов-продуцентов белка [131]. В работе [132] отражены данные, подтверждающие положительное влияние введения в питательную среду виноградных выжимок для активного роста микроорганизмов, в частности, гриба *A. awamori*. Ферменты, полученные путем твердофазной ферментации на виноградных выжимках, затем экстрагируют различными растворителями (Твин 80, цитратный, ацетатный буферные растворы) [133].

Отходы переработки цитрусовых культур (апельсиновые корки) также подходят для использования их в качестве компонента питательной среды, содержащего пектиновые вещества, целлюлозу и гемицеллюлозы, для выращивания культур микроскопических грибов: *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, *P. decumbens* [134, 135]. Отходы переработки яблок после получения из них сока используются в качестве среды для твердофазного культивирования гриба *A. niger* и получения на его основе пектиназ [136].

Таким образом, перспектива ферментативной экстракции целевых веществ из растительных материалов имеет высокий потенциал и является перспективной с точки зрения будущих технологий.

Итак, для увеличения эффективности производственных процессов, направленных на извлечение сока из плодового сырья, богатого полисахаридами, целесообразно применение ФП, содержащих ряд соответствующих ферментов для их разрушения. Существующий рынок ФП,

предназначенных для этой цели, непрерывно расширяется, приспособливаясь для всё большего количества плодовых субстратов, использование которых для получения напитков с заданными свойствами ранее не представлялось возможным. Таким образом, поиск новых ФП и исследование эффективности их воздействия на различные субстраты, является востребованной и необходимой задачей для специалистов соковой и винодельческой отраслей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Материалы

Штаммы грибов - продуцентов карбогидраз

Для получения ФП, обладающих необходимым для эффективной биоконверсии растительного сырья набором ферментов, использовали рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* РВ4 и РВ7. Данные штаммы были получены путем котрансформации целевыми плазмидами с генами пектинлиазы *pelA* (*P. canescens*) и β -глюкозидазы *bgIII* (*A. niger*) с трансформирующей плазмидой *pSTA 10* ауksотрофного штамма-реципиента *P. verruculosum* 537. Подробно процесс создания подобных рекомбинантных штаммов и ФП описан в работе [137].

В качестве контрольного выступал мутантный штамм-реципиент *P. verruculosum* В1 *niaD(-)* с дефектом в гене *niaD*, кодирующем фермент нитратредуктазу.

Коммерческие ферментные препараты

Для исследования эффективности воздействия лабораторных ФП на выбранные сорта винограда и отходы винодельческого производства в качестве контроля использовали субстраты, обработанные коммерческими ФП немецкого производителя «Dohler», разработанными для применения в винодельческой промышленности.

| Учетный номер ФП | Описание (коммерческое название и назначение препарата) |
|------------------|--|
| 2039 | «Тренолин Маш ДФ», жидкий ФП, предназначен для извлечения полезных компонентов из мезги белых сортов винограда |
| 2040 | «Тренолин Букет ДФ», жидкий ФП, предназначен для высвобождения терпенов из мезги белых сортов винограда |
| 2041 | «Тренолин Фильтро ДФ», жидкий ФП для оклейки и фильтрации (разрушение коллоидов) |
| 2042 | «Тренолин Термо ДФ», жидкий ФП для более полного экстрагирования ягод, разрушения пектинов и коллоидов |
| 2043 | «Тренолин Опти ДФ», сухой ФП для интенсификации экстракции красящих и ароматобразующих веществ, облегчает прессуемость, выход сока |
| 2044 | «Тренолин Супер ДФ», жидкий ФП, увеличивает выход сока, улучшает фильтрацию, оклеивание |

2045 «Тренолин Колор ДФ», сухой ФП, увеличивает выход цвета и доли стабилизирующих цвет компонентов виноградной ягоды

2046 «Тренолин Руж ДФ», жидкий ФП, высвобождает из мезги красных сортов винограда красящие и дубильные вещества

Растительные субстраты, используемые в работе

В качестве субстратов для получения фруктовых вин использовались три вида плодового сырья, распространенного в средней полосе РФ:

Рябина сортовая «Красавица» - сорт, отличающийся морозоустойчивостью и высокими органолептическими качествами.

Смородина черная сортовая «Олеандр» – садовый сорт с ранним сроком созревания.

Слива сортовая «Желтая Хопты» - универсальный сорт слив, обладающий высокой зимостойкостью, срок созревания поздний.

Плодовые субстраты были предоставлены РГАУ МСХА имени К.А. Тимирязева.

В экспериментах, направленных на оптимизацию процессов получения виноградных вин, участвовали следующие сорта винограда:

«Цимлянский Черный» - красный донской автохтонный сорт винограда, относится по морфологическим признакам к эколого-географической группе сортов винограда бассейна Черного моря;

«Каберне Совиньон» - французский сорт, распространен в Бордо, его культивируют во многих странах мира (Болгарии, странах бывшей Югославии, Италии, Румынии, США, Аргентине, Японии), урожай винограда используют в основном для приготовления марочных красных столовых вин, а также в купажах для получения высококачественных шампанских виноматериалов;

«Изабелла» - столово-технический (часто применяется для озеленения) сорт винограда позднего периода созревания, используется для потребления в свежем виде и приготовления ординарных вин;

«Ркацители» - один из наиболее широко распространенных в РФ грузинских сортов винограда, по морфологическим признакам и биологическим свойствам он относится к эколого-географической группе сортов винограда бассейна Черного моря, урожай используют для приготовления белых столовых сортовых вин, коньячных виноматериалов и виноградных соков.

Виноград был получен из отделения «Саркел» ОАО «Цимлянские вина».

В качестве отходов традиционной винодельческой промышленности были использованы сброженные выжимки красных технических сортов винограда, предоставленные для экспериментов ОАО «Цимлянские вина».

Выжимки технических сортов винограда:

| Сорт винограда | Влажность выжимок, % |
|----------------|----------------------|
| «Цвейилт» | 39,77 |
| «Жупский» | 48,94 |
| «Амур» | 40,13 |
| «Мерло» | 37,55 |

Лабораторные животные, используемые в экспериментах, и условия их содержания

В экспериментах использовали половозрелых самцов крыс линии Wistar массой 300-400 г и разновозрастных половозрелых самцов крыс линии Norway Brown массой 250-400 г. Источник животных – виварий ИНБИ РАН.

Карантин/адаптация. До начала эксперимента животных держали в отдельном помещении для проведения адаптации (14 дней). В течение этого времени вели наблюдение за животными с целью выявления отклонений жизненных показателей в соответствии с СОП «Прием животных, карантин, адаптация».

Идентификация. Каждому животному, участвовавшему в экспериментах, присваивали номер и метку, на клетке указывали номер группы, номера животных, идентификационные метки.

Содержание животных – в соответствии с СОП. Животным обеспечивали стандартный полноценный рацион из сухого и сочного кормов.

Субстраты и реактивы

В работе были использованы полимерные субстраты для определения ферментативных активностей применяемых ФП: карбоксиметил-целлюлоза (КМЦ) и микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), ксилан березы, а также *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (пНФГ), высокометилированный пектин из цитрусовых, полигалактуроновая кислота фирмы «Sigma» (США).

Для приготовления пластин с полиакриламидным гелем для электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия использовали реактивы фирм «Reanal» (Венгрия) и «Bio-Rad» (США). Окраску белка производили красителем Coomassie-Brilliant Blue G 250 фирмы «Ferrak» (Германия), использовали стандарты белков фирмы «Fermentas» (США).

Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом с использованием стандартного набора фирмы ООО «Импакт» (Россия).

Содержание микотоксинов определяли с помощью ИФА-наборов RIDASCREEN Aflatoxin Total и RIDASCREEN Ochratoxin A 15/30 фирмы «R-Biopharm AG» (Германия).

Используемые в экспериментах реактивы были марки х.ч. и ч.д.а производителей «ДиаМ», «Реахим», «Helicon» (Россия), «Panreac» (Испания).

3.2 Методы исследования

Режим культивирования штаммов-продуцентов и культивационные среды

Для поддержания штаммов, выращивания и хранения посевного материала использовали агаризованную среду: *минимальная среда PM* + 10 мМ NH_4Cl + 2,0 % агар. Посевной материал хранили при + 4 °С, с периодическим (через 2 – 3 месяца) проведением поддерживающего отбора; выращивали посевной материал в течение 6 суток в термостате при 30 °С.

Состав *минимальной среды PM* (% масс.):

KH_2PO_4 – 1,5;

KCl – 0,5;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;

H_3BO_3 – 0,0025;

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,02;

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,04;

$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04;

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04;

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,04;

Глюкоза – 1.

Культивирование штаммов проводили в 10-литровом ферментере при pH 4,5 и 32 °С в течение 144 часов, используя питательную среду состава (% масс.):

KH_2PO_4 – 1,5;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03;

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,03;

Дрожжевой экстракт – 1,0;

Целлюлоза (МКЦ) – 2,0;

Пшеничные отруби – 1,0.

Данная среда имеет сниженное содержание МКЦ по сравнению с используемым ранее для получения ФП на основе модифицированных штаммов *P. verruculosum* [138], что обеспечивает ее меньшую себестоимость.

В течение культивирования проводили подпитку глюкозой. После окончания ферментации с помощью ультрафильтрации КЖ на полых волокнах (с пределом отсека 10 кДа) и последующего лиофильного высушивания получали сухой ФП.

Методика проведения электрофореза белков в присутствии додецилсульфата натрия

Белковый гель-электрофорез в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли по стандартной методике фирмы «Bio-Rad» (США). Концентрация ПААГ составляла 12 %.

Пробы (20 мкл), наносимые в «карманы» геля, обессоливали, концентрация белка находилась в диапазоне 0,3-2 мг/мл (по методу Лоури). Перед нанесением пробы смешивали с буферным раствором для образцов (таблица 2) в соотношении 5:6, инкубировали смесь 15-20 мин при 100 °С, а затем центрифугировали 2 мин при 12000 об/мин. Для оценки молекулярной массы белков в образцах в один из «карманов» геля наносили смесь белков с известной молекулярной массой. В «карман» наносили 10 мкг белка.

Таблица 2 - Состав буферного раствора для образцов при проведении электрофореза.

| Компонент | Объем, мл |
|---|-----------|
| Вода бидистиллированная | 4 |
| 0,5 М Трис/НСl рН 6,8 | 1 |
| 10 % раствор додецилсульфата натрия | 1,6 |
| Глицерин | 0,8 |
| 0,05 % раствор бромфенолового синего | 0,2 |
| меркаптоэтанол (добавляется перед использованием) | 0,4 |

Методика определения концентрации белка (метод Лоури)

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури. При спектрофотометрических измерениях использовали спектрофотометр фирмы «VARIAN» Cary 50 Scan.

Метод основан на образовании биуретового комплекса, который в присутствии фенола дает характерную окраску пропорционально содержанию белка.

Реактивы: 0,1 N раствор NaOH; 2 % раствор Na₂CO₃ в 1 л раствора NaOH (реактив А); 0,5 % раствор CuSO₄*5H₂O в 1 % растворе виннокислого натрия (реактив В); реактив С (перед анализом 49 мл реактива А смешивают с реактивом В); реактив Фолина; реактив Е готовили из реактива Фолина, разводя его дистиллированной водой (1:1).

Ход анализа: 10 мг исследуемого ФП растворяли в 1 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора, готовили серию разведений. Из полученных растворов отбирали 100 мкл жидкости, добавляли 1 мл реактива С, через 10 минут приливали 0,1 мл реактива Е. Инкубировали в темноте в течение 40 минут, после чего определяли оптическую плотность на спектрофотометре при $\lambda=750$ нм.

Контроль: 0,1 мл 0,1 М Na-ацетатного буферного раствора.

Расчет: концентрацию белка в исследуемом образце определяли по формуле

$$C_{\text{белка}} = (A_{750} + b) * c * R, \quad (1)$$

где A_{750} – значение оптической плотности раствора при длине волны 750 нм;

b и c – коэффициенты, полученные из калибровочной кривой;

R – разбавление раствора.

Калибровочная кривая: 10 мг белка (ФП ВІ 221-151) растворяли в 1 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора (рН=5,0). Готовили серию разбавлений с концентрациями: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,2 мг/мл белка. Контроль – 100 мкл 0,1 М Na-ацетатного буферного раствора. Определение проводили аналогичным образом. После колориметрирования по полученным данным строили калибровочную кривую.

Методики определения ферментативных активностей

Целлюлазные (по МКЦ и КМЦ в качестве субстратов), полигалактуроназную и ксиланазную активности определяли, проводя гидролиз при 40 °С в течение 60 мин для активности при использовании МКЦ в качестве субстрата, при 50 °С в течение 10 мин для КМЦ-азной и полигалактуроназной активностей, при 50 °С в течение 5 мин для ксиланазной активности, останавливая реакцию добавлением реактива Шомоди и нагреванием проб до 100 °С. В качестве субстратов для определения этих активностей применялись: Avicel PH 105 (МКЦ), КМЦ средней вязкости, полигалактуроновая кислота, ксилан березы (Sigma, USA). В качестве продуктов реакции определяли ВС методом Шомоди-Нельсона [139, 140].

β -глюкозидазную активность определяли при использовании пНФГ (Sigma, USA) в качестве субстрата концентрацией 1мМ при 40 °С и рН 5,0. Для осуществления реакции гидролиза 0,1 мл запасного раствора пНФГ смешивали с 0,8 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора рН 5,0, вносили в реакционную смесь 0,1 мл ФП, инкубировали при 40 °С в течение 10 мин, останавливали реакцию добавлением стоп-реагента (0,5 мл 1 М раствора Na_2CO_3) и определяли оптическую плотность раствора при длине волны 400 нм.

Определение пектинлиазной активности проводили с помощью кинетического метода, основанного на количественном определении 4-5 ненасыщенного продукта реакции расщепления субстрата – цитрусового пектина (Sigma, USA). Детекцию этого продукта определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 235 нм. Реакцию проводили в кварцевой кювете двухлучевого спектрофотометра, имеющего термостатируемое кюветное отделение. На самописце регистрировали накопление продукта, поглощающего при длине волны 232 нм в течение 1-5 минут.

Кюветное отделение термостатировали при 40 °С. В кювету для образца и в кювету сравнения (кварцевые кюветы на 3 мл) помещали по 2,9 мл субстрата и термостатировали в кюветном отделении 5 мин. Определяли показания поглощения относительно кюветы сравнения. Затем в кювету для образца добавляли 100 мкл раствора ФП, тщательно перемешивали и регистрировали нарастание оптической плотности в течение 1-5 минут с помощью самописца.

За единицу активности во всех случаях принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль продукта реакции в минуту.

Методы фракционирования и очистки белков

Фракционирование ферментов проводили с помощью высокоэффективного белкового хроматографа АКТАPurifier («General Electric Healthcare», Швеция). Хроматографическая система включала: бинарный насос высокого давления P-900 с селектором входов, узел ввода образца INV-907, три проточных детектора (UPC-900) - ультрафиолетовый, кондуктометрический детекторы и детектор для измерения значения pH, систему автоматических кранов и клапанов (PV-908/V-3/M-925) для управления потоком, а также коллектор фракций Frac-950. Управление системой и сбор данных осуществляли с использованием программы UNICORN 6.4. Процесс выделения (элюцию белка с колонок) контролировали спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм.

Схема первичного фракционирования ФП и тонкой очистки ферментов включала:

- Обессоливание и удаление пигментов ФП на колонке с носителем Biogel P4 («Bio-Rad», США), уравновешенной 20 мМ буфером бис-Трис/НСl (pH 6,8).
- Фракционирование с помощью анионообменной хроматографии на колонке Mono Q (5*50 мм) и Source 15 Q ((16×100 мм), «GE Healthcare», Швеция). Колонку кондиционировали согласно руководству «Instructions 71-5071-88 AF, Ion Exchange Columns. Mono Q 5/50 GL and Mono S 5/50 GL», затем уравновешивали в стартовом 20 мМ буфером бис-Трис/НСl, pH 6,8. Раствор белка в стартовом буфере наносили на колонку, промывали до установления стабильной базовой линии, после чего элюировали связавшийся белок в градиенте ионной силы. В качестве буфера для элюирования использовали 1 М раствор NaCl в стартовом буфере, градиент от 0 до 40 % за 30 объемов колонки; скорость потока составляла 1 и 4 мл/мин для колонок MonoQ и Source15Q соответственно. Значение pH полученных фракций доводили до 5,0 при помощи 1 М Na-ацетатного буфера.
- Гидрофобную хроматографию белковых фракций, полученных на предыдущей стадии, проводили на колонке с носителем Source 15ISO объемом 1 мл («GE Healthcare», Швеция), уравновешенной 50 мМ Na-ацетатным буферным раствором (pH 5,0) в присутствии 1,7 М сульфата аммония. Связавшиеся белки элюировали в нисходящем градиенте сульфата аммония от 1,7 до 0 М в течении 25 объемов колонки, скорость потока составляла 0,5 мл/мин.

Методика проведения ферментативной обработки плодов и винограда

Обработку на начальном этапе работы проводили при 50 °С – для плодового сырья, при 20 °С – для винограда, титруемой кислотности 6,8 г/дм³ (в случае плодового сырья) и скорости перемешивания реакционной смеси 900 об/мин. Через 3, 24 и 48 ч отбирали пробы для анализа содержания ВС и глюкозы, ферментативную реакцию останавливали разведением пробы 0,1 М

ацетатным буферным раствором (рН 5,0). После 48 часов обработки определяли выход самотечной фракции сока через складчатый фильтр за 15 минут.

Объем каждой пробы составлял 20 мл и включал: фруктовое или виноградное пюре, антибиотик, 0,1 М буферный раствор (рН=5,0), раствор ФП (20 мг белка/мл), дистиллированную воду (для фруктовых субстратов). Фрукты помещали в пластиковый контейнер объемом 60 мл. Разбавление проб фруктовых субстратов соответствовало титруемой кислотности, характерной для фруктовых и виноградных вин. ФП вносили в различных дозировках: 0,02; 0,03; 0,05 % от массы субстрата. Дозировки ФП рассчитывали с учетом содержания в них белка.

В качестве антибиотика для предотвращения заражения реакционной смеси использовали ампициллин или ампиокс, концентрация антибиотика в реакционной смеси составляла 10 мг/г. В пластиковые контейнеры с пробами для лучшего перемешивания помещали металлические мешальники.

Для определения оптимальных условий обработки плодов и винограда в случае необходимости варьировали температуру процесса обработки, время гидролиза и дозировку ФП.

Методика проведения ферментативной обработки виноградных выжимок

Мацерацию проводили в пластиковых контейнерах объемом 60 мл при 50 °С, рН 5,0 и 900 об/мин. В контейнеры с образцами для лучшего перемешивания помещали металлические мешальники. Через 3, 24 и 48 часов определяли содержание ВС и глюкозы (г/дм³), а также содержание в пробах фенольных соединений методом ВЭЖХ.

Каждая проба составляла 20 мл, включала в себя: измельченные виноградные выжимки, раствор ФП 50 мг/мл, дистиллированную воду, 0,1 М ацетатный буферный раствор рН 5,0, ампициллин, 1 М NaN₃. Разбавление пробы обеспечивало эффективное перемешивание субстрата и экстракцию. Дозировка ФП составляла 2, 5, 10 мг белка/г с.в. субстрата.

В ходе экспериментов определяли оптимальный режим обработки виноградных выжимок (время обработки и дозировку ФП) с точки зрения накопления в пробах ВС и фенольных соединений.

Методика определения концентрации восстанавливающих сахаров

Концентрацию ВС определяли методом Шомоди-Нельсона [141, 142]. Принцип метода заключается в следующем: ВС, образовавшиеся при ферментативном гидролизе полисахаридов, количественно окисляются реактивом Шомоди в щелочной среде (рН>9) при кипячении с образованием оксида меди (I). Затем образовавшийся оксид меди (I) окисляется арсеномолибдатным реактивом Нельсона в кислой среде (рН 1,7-2,0) с образованием молибденовой сини, окраска которой устойчива в течение 24-36 часов.

Ход анализа: Отбирали 0,65 мл исследуемой пробы, центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин, затем определяли содержание ВС в надосадочной жидкости. К 200 мкл исследуемого раствора прибавляли 200 мкл реактива Шомоди, перемешивали, выдерживали на водяной бане 40 минут, охлаждали. Затем вносили в пробу 200 мкл реактива Нельсона, перемешивали, выдерживали 10-15 минут при 25 °С, добавляли 400 мкл ацетона и 1000 мкл дистиллированной воды, центрифугировали в течение 1 минуты при 1000 об/мин, измеряли оптическую плотность при 610 нм. В качестве контроля использовали 0,1 М ацетатный буферный раствор (рН=5,0).

Расчет: концентрацию ВС в исследуемых образцах определяли по формуле

$$C_{BC} = (A_{610} + b) * c * R, \quad (2)$$

где A_{610} – значение оптической плотности раствора при длине волны 610 нм;

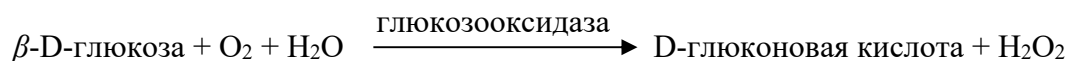
b и c – коэффициенты, полученные из калибровочной кривой;

R – разбавление раствора.

Калибровочная кривая: 10 мг глюкозы растворяли в 1 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора (рН=5,0), готовили ряд разбавлений: 0,015; 0,02; 0,025; 0,03; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18; 0,2 мг/мл глюкозы. Определение проводили - как описано выше, после колориметрирования по полученным цифрам строили калибровочную кривую.

Методика определения концентрации глюкозы

Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом, описанным в аннотации к набору реактивов “Фотоглюкоза” фирмы ООО “Импакт”. Метод основан на высокоселективной ферментативной реакции, катализируемой глюкозооксидазой:



При помощи спектрофотометра регистрировали оптическую плотность растворов окрашенных продуктов окисления субстрата *o*-дианизидина, образующихся в результате катализируемой пероксидазой реакции окисления *o*-дианизидина с перекисью водорода. Предварительно готовили рабочие растворы № 1, 2 и 3 по указаниям инструкции набора. Далее в кювету (1 см) вносили 100 мкл исследуемого раствора и 1 мл раствора № 3, термостатировали 15 мин при 40 °С, после чего измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 490 нм. В качестве фона использовали 0,1 М ацетатный буферный раствор (рН 5,0). По стандартной калибровочной зависимости определяли содержание глюкозы в исследуемых образцах по формуле

$$C_{\text{глюкозы}} = (A_{490} - A_{490 \text{ фона}}) / b, \quad (3)$$

где A_{490} – значение оптической плотности раствора при длине волны 490 нм;

b – тангенс в уравнении аппроксимирующей калибровочной прямой.

Калибровочный график строили для каждой партии образцов.

Пробы гидролизата перед определением центрифугировали, содержание глюкозы измеряли в надосадочной жидкости.

Методика определения выхода сока из плодово-ягодных субстратов

Выход самотечной фракции сока определяли, как объем сока, стекающего в мерный цилиндр через складчатый бумажный фильтр за 15 минут. Объем пробы после гидролиза составлял 18,5 мл.

Методика определения вязкости сусла

Образцы предварительно центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Вискозиметр Оствальда термостатировали при 20 °С, вносили 5 мл анализируемого раствора и инкубировали 5 мин. Определяли время истечения раствора в трех повторностях или до трех сходимых значений (один знак после запятой).

Вязкость раствора рассчитывали, используя калибровочную кривую вискозиметра, построенную с помощью ряда жидкостей с известной вязкостью (вода, ацетон, этанол, н-бутанол, изо-пропанол).

Методика определения массовой доли взвесей в сусле

Содержание взвесей определяли гравиметрически, отделяя их центрифугированием.

В предварительно взвешенные пластиковые пробирки помещали по 10 мл образца и центрифугировали (3000 об/мин) в течение 10 мин. Осветленный раствор сливали, оставляя пробирки с осадком в течение 1 мин в перевернутом положении. Сырой осадок вместе с пробиркой взвешивали с точностью до второго знака.

Содержание взвесей рассчитывали по формуле

$$C=(m_2-m_1)*100/V, \quad (4)$$

где m_2 – масса центрифужной пробирки с осадком взвесей, г;

m_1 – масса пустой центрифужной пробирки, г;

V – объем пробы, мл.

Физико-химические методы исследования виноматериалов

- Методика определения объемной доли этилового спирта – в соответствии с [141].
- Методика определения сахаров – по методу Шомоди-Нельсона [139, 140].
- Методика определения массовой концентрации титруемых кислот – в соответствии с [142].
- Методика определения массовой концентрации летучих кислот – в соответствии с [143].
- Методика определения массовой концентрации приведенного экстракта – в соответствии с [144].
- Методика определения свободного и общего диоксида серы – в соответствии с [145].

- Методика определения концентрации белка в готовых виноматериалах – по методу Къельдаля [146].

- Методика определения характеристик окраски вин спектрометрическим методом [147]. Измерение оптической плотности (A) вин проводили с помощью спектрофотометра при длинах волн: 420, 520 и 620 нм, а также измерение пропускания света (T , %) при длинах волн: 495, 550 и 625 нм (в 1-см кювете). Характеристики окраски образцов вин рассчитывались по приведенным ниже специальным формулам арбитражного метода и методов текущих определений.

Интенсивность определяли по формуле

$$I=(A_{420}+A_{520}+A_{620})/l, \quad (5)$$

где l – длина оптического пути.

Оттенок определяли по формуле

$$N=A_{420}/A_{520}. \quad (6)$$

Относительную яркость определяли по формуле

$$Y=0,2T_{625}+0,63T_{550}+0,17T_{495}. \quad (7)$$

- Методика определения общего содержания фенольных соединений с помощью реактива Фолина-Чокальтеу. Метод основан на том, что реактив Фолина-Чокальтеу при добавлении в вино окисляет фенольные группы, восстанавливаясь до продуктов, окрашенных в голубой цвет.

Ход анализа: 1 мл пробы вина (адекватно разбавленного) смешивали с 250 мкл 20 %-ого Ca_2CO_3 и 25 мкл реактива Фолина-Чокальтеу. Выдерживали смесь в течение 30 минут, после чего измеряли оптическую плотность при 700 нм [148].

Расчет содержания фенолов в образцах вели по формуле

$$C(\text{фенолов})=A/0,0011, \quad (8)$$

где 0,0011 – тангенс угла наклона калибровочного графика.

Калибровочную кривую для определения общего содержания полифенольных соединений строили по растворам галловой кислоты концентраций 50-500 мг/л с шагом 50 мг/л относительно холостой пробы.

- Методика определения содержания антоцианов.

Ход анализа: перед определением образец исследуемого вина предварительно разбавляли буферными растворами: соляная кислота-хлорид калия (рН 1,0) и соляная кислота-ацетат натрия (рН 4,5). Готовили разведения образцов вина так, чтобы оптическая плотность растворов составляла 0,4-0,6 при рН 1,0. Образцы, растворенные буферным раствором с рН 1,0, оставляли в покое на 15 минут перед измерениями. Образцы, растворенные в буферном растворе с рН 4,5 готовы к измерению через 5 минут. Оптическую плотность образцов

измеряли на спектрофотометре при длинах волн 510 и 700 нм. Соответствующий буферный раствор использовали как раствор сравнения.

Расчет: Концентрацию антоцианов в образце определяли по представленной ниже формуле

$$C = \Delta D * Mr * 10^3 * P / (\varepsilon_{\lambda} * l), \quad (9)$$

где $\Delta D = (D_{510nm_pH1,0} - D_{700nm_pH1,0}) - (D_{510nm_pH4,5} - D_{700nm_pH4,5})$;

для вина $\varepsilon_{\lambda} = 26900 \text{ дм}^3/(\text{моль} * \text{см})$;

$Mr = 449 \text{ г/моль}$;

$P = 135$ – разбавление;

$l = 1$.

• Органолептическую оценку готовых виноматериалов проводили в соответствии с ГОСТом [149]. Для осуществления анализа виноградных и фруктовых вин было выбрано 7 человек из работников лаборатории. Заведомо был утвержден ряд дескрипторов и терминов, с помощью которых стало возможно наиболее полно оценить органолептические качества образцов [150]. На основе этих терминов были составлены 10-балльные оценочные карты, использующие якорные термины: «слабый», «маленький» или «отсутствует» для левого якоря и «сильный» или «значительный» для правого якоря [151]. При статистической оценке результатов из выборки исключались экстремальные значения для достижения приемлемого уровня однородности выборки.

Для определения характеристик цвета и прозрачности каждого образца было выбрано 2 термина, для характеристики аромата – 5 терминов, вкуса и послевкусия – 5 терминов, консистенции – 1 термин. Образцы подавались в объеме 50 мл в прозрачных пластиковых стаканах и были закодированы трехзначным числовым кодом. По результатам проведенных тестов составляли лепестковые диаграммы для наглядного сравнения образцов.

Методика определения содержания фенольных веществ в ферментолизатах сброженных виноградных выжимок с помощью ВЭЖХ

Состав фенольных соединений, перешедших в раствор ферментолизата из выжимок, определяли методом ВЭЖХ, используя жидкостной хроматограф Agilent 1100 Series HPLC, ультрафиолетовый детектор, колонку Hypersil C18. Элюирующими буферными растворами служили: А – 2 % раствор CH_3COOH в воде, В – 2 % CH_3COOH в 50 % CH_3CN .

Подготовка образцов ферментолизатов состояла в экстрагировании полифенолов гексаном (1:1), перемешивании и центрифугировании при 13400 об/мин.

В качестве стандартов использовали галловую кислоту, пирокатехин, 3,4-дигидроксibenзойную кислоту, 4-гидроксibenзойную кислоту, 2-гидроксифенилуксусную

кислоту, ванилиновую, кофеиновую, сиреневую кислоты. Предварительно готовились растворы стандартов с концентрацией 10 г/л в 25мМоль фосфатном буферном растворе (рН 2,8). Концентрация каждого соединения в смеси сравнения составляла 0,1 г/л.

Объем пробы для детекции составлял 20 мкл, режим элюирования пробы представлен в таблице 3.

Таблица 3 - Режим элюирования при проведении анализа содержания фенольных соединений в ферментолизатах с помощью ВЭЖХ.

| Время, мин | Содержание В, % | Скорость потока, мл/мин | Давление, бар |
|------------|-----------------|-------------------------|---------------|
| 0 | 0 | 1,25 | 200 |
| 6,4 | 2 | 1,25 | 200 |
| 28,8 | 23 | 1,25 | 200 |
| 45,6 | 38 | 1,25 | 200 |
| 49,6 | 100 | 1,25 | 200 |
| 54 | 100 | 1,25 | 200 |
| 55 | 0 | 1,25 | 200 |
| 65 | 0 | 1,25 | 200 |

Определение содержания микотоксинов в ферментном препарате и виноматериалах,
полученных с его использованием

Определение содержания микотоксинов в ФП и продуктах ферментативного гидролиза (винах) проводили с помощью наборов RIDASCREEN торговой марки «R-Biopharm AG» (Дармштадт, Германия), предназначенных для количественного определения микотоксинов (афлатоксинов и охратоксина А) в зерне и кормах методом конкурентного иммуноферментного анализа. В наборы включены стандарты определяемых веществ в возрастающей концентрации для построения калибровочных кривых. Для проведения анализа использовали микропланшетный ИФА-анализатор.

Ход анализа при определении содержания афлатоксинов с помощью набора RIDASCREEN Aflatoxin Total: В лунки стрипов микротитровального планшета, покрытые антителами захвата, связывающимися с анти-афлатоксиновыми антителами, добавляли стандартные или исследуемые растворы, а также конъюгат афлатоксина с ферментом и анти-афлатоксиновые антитела. Свободный афлатоксин и конъюгат афлатоксина с ферментом конкурировали за центры связывания антител афлатоксина. В то же время, анти-афлатоксиновые антитела связывались неподвижными антителами захвата. Не связавшийся ферментный конъюгат затем удаляли. Далее в лунки планшета добавляли раствор хромогенного субстрата, который под действием ферментного конъюгата преобразовывался в вещество голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводило к изменению цвета с голубого на желтый. Далее измеряли

оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, которая была обратно пропорциональна концентрации афлатоксина в пробе. По стандартам, входящим в раствор, строили калибровочный график.

Характеристика набора:

- Предел обнаружения (в сыворотке крови): 50 нг/л.
- Полнота извлечения, соответствующая стандартному веществу: 85 %.
- Специфичность тест-системы (установлена посредством определения перекрестной чувствительности к соответствующим микотоксинам в буферной системе):

афлатоксин В₁ 100 %,

афлатоксин В₂ 48 %,

афлатоксин G₁ 75 %,

афлатоксин G₂ 18 %.

Ход анализа при определении содержания охратоксина А с помощью набора RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15: В лунки стрипов микротитровального планшета, покрытые специфическими антителами, связывающимися с охратоксином А, добавляли стандартные или исследуемые растворы, а также конъюгат охратоксина А с ферментом. Свободный охратоксин А и конъюгат охратоксина А с ферментом конкурировали за центры связывания антител охратоксина А. Не связавшийся конъюгат с ферментом удаляли. Далее в лунки планшета добавляли хромогенный субстрат. Связавшийся ферментный конъюгат преобразовывал хромоген в вещество голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводило к изменению цвета с голубого на желтый. Далее измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, которая была обратно пропорциональна концентрации охратоксина А в образце.

Характеристика набора:

- Предел обнаружения (в сыворотке крови): 50 нг/л.
- Полнота извлечения, соответствующая стандартному веществу: 100 %.
- Специфичность тест-системы (установлена посредством определения перекрестной чувствительности к соответствующим микотоксинам):

охратоксин А 100 %,

охратоксин С 44 %,

охратоксин В 14 %,

охратоксин α менее 0,1 %.

Для построения калибровочных кривых и определения параметров логорифмической функции использовали программу Origin Pro 9. Для каждой серии экспериментов строили новые калибровочные кривые.

Пробоподготовка ферментного препарата: Лабораторный ФП, представляющий собой лиофилизат культуральной жидкости гриба *P. verruculosum*, содержал белки, отходы жизнедеятельности микроорганизма, компоненты питательной среды.

Схемы предобработки ферментного препарата

RIDASCREEN Aflatoxin Total

- Растворение ФП в 50 % метиловом спирте (5 мг белка/мл).

- Разбавление раствора ФП в 5 раз до содержания метилового спирта в растворе 10 %.

- Фильтрация раствора сквозь шприцевый фильтр с размером пор 0,2 мкм.

RIDASCREEN Ochratoxin A 15/30

- Растворение ФП в 0,13 М растворе гидрокарбоната натрия (5 мг белка/мл).

- Разбавление раствора в 5 раз.

- Фильтрация раствора сквозь шприцевый фильтр с размером пор 0,2 мкм.

Так как в коммерческом ФП «Букет ДФ», использовавшемся в качестве контроля, предполагалось низкое содержание микотоксинов, при определении их содержания в нем готовили растворы с начальной концентрацией белка 10 мг/мл.

Схемы предобработки лабораторного ферментного препарата, включающие предварительную очистку методом ультрафильтрации

RIDASCREEN Aflatoxin Total

- Растворение ФП в воде (10 мг белка/мл).

- Ультрафильтрация с помощью концентрирующего патрона Vivaspin 500 (мембрана PES 5,000) в центрифуге (15000 об/мин, 4 °С, 15 мин), двукратное доведение образцов до первоначального объема – 500 мкл.

- Концентрирование пробы в патроне до 400 мкл, доведение до первоначального объема 50 % раствором MeOH.

- Разбавление раствора 10 % MeOH в 2 раза.

RIDASCREEN Ochratoxin A 15/30

- Растворение ФП в 0,13 М растворе гидрокарбоната натрия (10 мг белка/мл).

- Ультрафильтрация с помощью концентрирующего патрона Vivaspin 500 (мембрана PES 5,000) в центрифуге (15000 об/мин, 4 °С, 15 мин), трехкратное доведение образцов до первоначального объема – 500 мкл.

- Разбавление раствора буфером в 2 раза.

Пробоподготовка образцов вин: Образцы вин в объеме 20 мл освобождали от этилового спирта на ротационном испарителе при 35 °С. Перегонка вин не допускалась из-за высокой температуры нагрева образцов, приводящей к разрушению извлекаемых компонентов (микотоксинов). Остаток, не содержащий спирта, доводили до начального объема и вносили в патрон ISOLUTE, образец должен полностью поглотиться диатомитом. Пробу выдерживали в

патроне 5 минут, затем вносили 40 мл растворителя (очищенный хлороформ). Образцы, прошедшие через патрон, освобождали от водной окрашенной фракции с помощью делительной воронки, затем испаряли хлороформ на ротационном испарителе, и полученную пленку сразу перерастворяли в буферном растворе или растворе метанола (в зависимости от методики дальнейшего анализа).

Для проверки эффективности разработанной методики предобработки вин проводили определение микотоксинов в контрольных образцах вин, заведомо свободных от микотоксинов (изготовленных без применения ФП), в которые вносили стандартные растворы микотоксинов известной концентрации – тест «введено-найдено».

Кроме поправочных коэффициентов, полученных в результате теста «введено-найдено», при определении содержания микотоксинов в винах учитывали фон (пробу контрольного образца, изготовленного без применения ФП) и то, что в течение процесса предобработки происходило двукратное концентрирование проб.

Исследование острой токсичности ферментного препарата на лабораторных животных (крысах линии Wistar)

В эксперименте участвовало 15 животных (три группы из пяти животных). Группы животных формировали так, чтобы отклонение индивидуальной массы животного от средней массы животных внутри группы не превышало 10 %. Для определения показателей острой токсичности ФП вводили белым крысам-самцам однократно внутрижелудочно с помощью зонда растворы ФП в воде (группы животных № 1 и № 2), руководствуясь методом Литчфилда-Уилкоксона. Контрольным животным (группа животных № 3) вводили аналогичные максимальные объемы воды [152]. Максимальный объем вводимого раствора для крыс – 5 мл.

Применялись следующие дозировки ФП: 135 мг белка/кг веса (группа № 1) - дозировка препарата, основанная на содержании общего белка (по Кьельдалю) в летальной разовой дозе потребления алкоголя для человека (столового вина) согласно ВОЗ [153]. Проводили пересчет дозировки по поверхности тела [154];

5000 мг белка/кг веса (группа № 2) - дозировка, обеспечивающая возможность отнесения ФП к 3-му либо 4-му классу опасности в соответствии с [155].

Учитывая вероятность низкой токсичности ФП и, как следствие, невозможность определения ЛД₅₀, максимальную дозировку выбирали не менее 2 г белка/кг веса [156].

После ввода ФП и воды (контрольная группа) животных наблюдали 14 дней и регистрировали клинические симптомы интоксикации. До начала эксперимента, а также на 2, 7 и 14 дни производили взвешивание животных для отслеживания динамики веса.

Через 14 дней животные всех экспериментальных групп были подвергнуты эвтаназии углекислым газом и патоморфологическому исследованию. Осмотр включал подробное

описание: шерсти крыс, состояния кожи и подкожной клетчатки, грудной и брюшной полости, тимуса, сердца, легких, желудка, печени, почек, надпочечников, селезенки, семенников, головного мозга. Массовые коэффициенты органов определяли по формуле

$$MK_{органа} = \frac{вес_органа * 1000}{вес_животного} \quad (10)$$

Исследование ферментного препарата в аллергической реакции иммунных комплексов на лабораторных животных (крысах линии Wistar)

Для постановки реакции использовали 15 белых крыс-самцов (три группы из пяти животных). Группы животных формировали так, чтобы отклонение индивидуальной массы животного от средней массы животных внутри группы не превышало 10 %. Группам № 1 и № 2 внутрибрюшинно, пятикратно, с интервалом в 6 суток вводили ФП в дозировках 50 и 100 мг белка/кг веса соответственно (сенсibilизация) [157]. Животным контрольной группы № 3 вводили по той же схеме и в том же объеме растворитель (150 мМ раствор NaCl). Объем инъекции составлял 0,2 мл. Через 10 суток после последнего введения ФП на выстриженном участке кожи осуществляли введение разрешающей дозы внутрикожно. Учет реакции проводили визуально, начиная с 30-й минуты после введения разрешающей дозы.

Разрешающую дозу ФП определяли на интактных животных. Этим животным выстригали два участка кожи, на одном из них осуществляли введение ФП в дозировках: 450, 225, 125 мг белка/кг веса. Максимальная дозировка в данном случае была продиктована растворимостью препарата в растворителе (150 мМоль раствор NaCl) и допустимостью вводимого объема жидкости под кожу (0,6 мл). На другом участке кожи этим же животным вводили растворитель для контроля реактивности кожи. За разрешающую дозу принимали наибольшую концентрацию ФП, не вызывающую видимых изменений в коже через 1 час после внутрикожного введения (по сравнению с контрольным участком кожи).

Учет реакции проводили визуально через 24 часа и оценивали в баллах по С.В. Суворову по следующей шкале:

- 0 - видимой реакции нет;
- 1 - бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;
- 2 - ярко-розовая эритема по всему участку или по его периферии;
- 3 - красная эритема по всему участку;
- 4 - инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы;
- 5 - эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления (некроз), возможны геморрагии, образование корочек.

Исследование алергизирующего действия ферментного препарата на лабораторных животных при внутрижелудочном введении (крысы линий Wistar и Norway Brown)

Для осуществления эксперимента использовали 15 норвежских коричневых крыс-самцов (три группы из пяти животных) и 15 белых крыс-самцов (три группы из пяти животных). Группы животных формировали так, чтобы в каждой группе находились разновозрастные животные с различной индивидуальной массой, а средняя масса животных в группах не отличалась более чем на 10 %.

Животным групп № 1 внутрижелудочно с помощью зонда вводили раствор ФП в воде в концентрации 350 мг белка/кг веса (сенсбилизация) в течение 42 дней [158]. Животным групп № 2 тем же путем по той же схеме в качестве первого контроля вводили экстракт красного полусухого виноматериала из сорта винограда «Цимлянский Черный» в концентрации 35 мг белка/кг веса. Дозировку экстракта подбирали, исходя из количества общего белка, содержащегося в рекомендуемой суточной норме потребления алкоголя согласно ВОЗ [153]. Проводили пересчет дозировки по поверхности тела [154]. Экстракт получали выпариванием виноматериала на ротационном испарителе при 40 °С. Содержание общего белка (по Кьельдалю) в экстракте, свободном от этилового спирта, составляло 13 мг белка/мл. Животным групп № 3 в качестве второго контроля тем же путем по той же схеме вводили воду. Объем вводимой жидкости не превышал 1 мл.

Далее в течение 7 дней (индукционный период) животные всех групп находились в покое. На 49-ый день эксперимента животным всех групп вводили разрешающую дозу ФП, которая в 5 раз превосходила сенсбилизующую [158]. Далее животные всех экспериментальных групп были подвергнуты эвтаназии углекислым газом со взятием мазков крови для определения основных показателей микроскопированием, а также фрагментов двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника в качестве гистологических образцов, которые фиксировали 10 % раствором формалина (4 % формальдегида) и хранили до приготовления гистологических срезов.

Приготовление гистологических срезов:

1. Отмывка фиксированного материала от формалина – 80 минут в проточной воде;
2. Выравнивание кусочков ткани по краям и помещение в гистологическую проводку:
 - 70 % об. спирт – 30 мин,
 - 96 % об. спирт – 30 мин,
 - 100 % об. спирт – 30 мин,
 - спирт-хлороформ (1:1) – до погружения на дно,
 - хлороформ - до погружения на дно,
 - гистамикс – 120 мин;

3. Заливка в парафин;
4. Микротомные срезы толщиной 5 микрон;
5. Депарафинирование препаратов в ксилоле, проводка по спиртам до воды. Далее: окраска гематоксилином – 5 минут, отмывка проточной водой – 10 минут, докрашивание эозином – 10 минут, отмывка дистиллированной водой;
6. Гистологическая проводка до ксилола, заключение препаратов под покровные стёкла.

Гистологические препараты оценивали по следующим критериям [159]:

- толщина и длина ворсинок (на продольных срезах на малом увеличении объектива), ширина лимфатического сосуда (наличие его расширения);
- состояние цилиндрического кишечного эпителия (наличие дегенеративно-дистрофических изменений, отслоения – при большом увеличении объектива);
- состояние крипт (расширение, наличие абсцессов), а также наличие признаков фиброза;
- количество интраэпителиальных лимфоцитов в цилиндрическом эпителии (количество лимфоцитов в пласте эпителия при ув.40);
- количество лимфоцитов, плазматических клеток, эозинофилов и нейтрофилов в собственной пластинке слизистой оболочки.

Статистическая обработка и сравнение экспериментальных данных

Получение данных аналитических методов исследования проводили минимум в трех повторностях каждое. Для представления числового материала использовали средние значения и стандартное отклонение в качестве показателя рассеяния. Характеризуя возникающую ошибку, с помощью критерия Стьюдента рассчитывали доверительный интервал. Обработку данных органолептического анализа осуществляли с помощью Стьюдент-теста, оценивая значимость различий парных значений дескрипторов для опытных и контрольных образцов [160]. Статистическую значимость результатов тестов, проводимых с использованием лабораторных животных, также определяли с помощью t-критерия [161]. При обработке результатов использовали заданный уровень вероятности 0,95.

При однократных прямых измерениях объема получаемого в ходе работы сока (сусла) границы погрешности результатов соответствовали указанной точности прибора (мерного цилиндра).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 4 СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

4.1 Свойства исследуемых лабораторных ферментных препаратов

На начальных этапах работы получали новые ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7 с помощью рекомбинантных штаммов гриба *P. verruculosum* РВ4 и РВ7, содержащих ряд ферментов, обеспечивающих разрушение основных полисахаридов плодов. Штаммы культивировали на средах с пониженным содержанием целлюлозы (2 % МКЦ), корректируя тем самым их производственную себестоимость, затем определяли ферментативные активности, компонентный состав ФП, содержание в них белка.

Штаммы *Penicillium verruculosum* РВ4 и РВ7 были выбраны для исследования, так как состав получаемых на их основе ФП отвечал требованиям эффективной биоконверсии компонентов растительной стенки плодов, основными составляющими которой являются целлюлоза, гемицеллюлозы и пектин. Следовательно, применение этих ФП в соковой и винодельческой промышленности может потенциально оптимизировать ряд технологических процессов. В качестве контроля использовали также ФП ВІ *niaD*(-), полученный с помощью штамма-реципиента, секретирующего комплекс целлюлаз [138].

Определение состава и ферментативных активностей новых ФП по отношению к различным субстратам позволило предсказать возможности их использования для обработки растительного сырья разного состава, а также сравнить эти ФП с получаемыми ранее на среде с более высоким содержанием целлюлозы. На рисунке 4 представлена электрофореграмма ФП с указанием основных входящих в их состав индивидуальных ферментов.

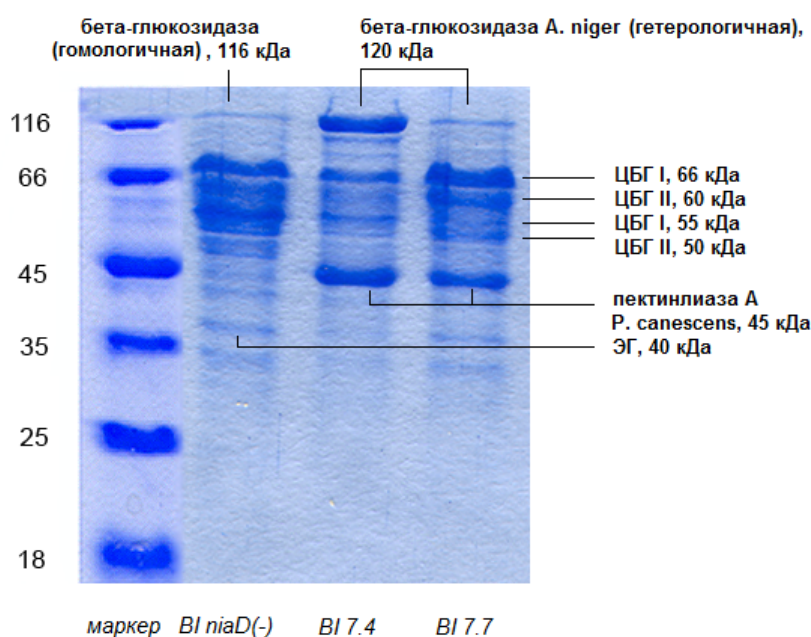


Рисунок 4 - Электрофореграмма лабораторных ФП, где ЦБГ – целлобиогидролаза, ЭГ – эндо-1,4-β-глюканаза.

Масса гетерологичной пектинлиазы А (*Penicillium canescens*), присутствующей в ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7, составила 45 кДа. ФП ВІ 7.4 содержит гетерологичную β-глюкозидазу (*A. niger*) с массой 120 кДа, количество которой в ФП ВІ 7.7, в соответствии с рисунком 4, значительно ниже; ФП из исходного штамма *P. verruculosum* содержит гомогенную β-глюкозидазу (116 кДа). В состав исследуемых ФП входит ряд целлюлолитических активностей (*P. verruculosum*): целлобиогидролаза I (66 кДа, 55 кДа), целлобиогидролаза II (60 кДа, 50 кДа), в ФП ВІ niaD(-) идентифицируется эндо-1,4-β-глюканаза (40 кДа).

Содержание белка в ФП определяли с помощью метода Лоури, в качестве стандарта использовали ФП ВІ 221-151 с известным содержанием белка, наиболее близкий по составу к используемым в работе.

Активности лабораторных ФП по отношению к различным субстратам представлены в таблице 4. Дозировки ФП далее рассчитывали, исходя из содержания в них общего белка.

Таблица 4 - Основные удельные ферментативные активности используемых в работе лабораторных ФП и содержание в них белка.

| ФП | Содержание белка, мг/г ФП | Активность, ед/мг белка | | | | | |
|------------|---------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------|
| | | Ксиланазная | β-Глюкозидазная | Целлюлазная (КМЦ) | Целлюлазная (МКЦ) | Полигалактуроназная | Пектинлиазная |
| ВІ 7.4 | 885±120 | 3,18±0,09 | 6,7±0,4 | 3,7±0,3 | 0,20±0,01 | 1,01±0,02 | 3,55±0,22 |
| ВІ 7.7 | 608±85 | 7,3±0,5 | 0,98±0,08 | 5,1±0,4 | 0,30±0,02 | 1,3±0,1 | 2,30±0,17 |
| ВІ niaD(-) | 960±116 | 10,9±0,7 | 1,01±0,08 | 5,3±0,4 | 0,29±0,02 | - | - |

Сравнивая значения определяемых удельных ферментативных активностей в лабораторных ФП, отметим, что ксиланазная активность в ФП ВІ niaD(-) выше, чем в ФП, полученных с помощью рекомбинантных штаммов. Тем не менее, ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7 характеризуются приобретенными β-глюкозидазной и пектинлиазной активностями. В ФП ВІ 7.4 данные активности наиболее высоки, тогда как ксиланазная и целлюлазные активности выше в ФП ВІ 7.7 по отношению к ФП ВІ 7.4. Полученные данные отвечают значениям ферментативных активностей в составе ФП, получаемых ранее тем же способом [138] на средах с содержанием МКЦ 4 % и предназначенных для переработки плодово-ягодного сырья, что делает возможным предположение о высокой эффективности биоконверсии растительного сырья с помощью данных ФП.

Компонентный состав полученных ФП определяли с помощью методов анионообменной и гидрофобной хроматографии, белки в составе ФП фракционировали, выделяли и очищали по схеме, предложенной в работе [162]. Во фракциях гомогенных белков измеряли активности по отношению к специфичным субстратам и концентрацию белка. Сопоставив полученные данные со сведениями об удельных активностях ферментов, рассчитывали компонентный состав ФП VI 7.4, VI 7.7 и VI niaD(-), представленный в таблице 5.

Таблица 5 - Основные компоненты ФП, полученных на основе штаммов гриба *P. verruculosum* PB4, PB7 и VI niaD (-).

| Гриб | Штамм | ФП | ПЕЛ, % | ЦБГ, % | ЭГ, % | БГЛ, % | Другие компоненты, % |
|-----------------------|--------------------------|-------------|-----------|-----------|----------|-----------|-------------------------|
| <i>P.verruculosum</i> | PB4 | VI 7.4 | 35 | 41 | 10 | 12 | 2 |
| | | VI 6.4* | 33 | 40 | 11 | 12 | 4 |
| | PB7 | VI 7.7 | 33 | 40 | 9 | 5 | 12 |
| | | VI 6.7* | 34 | 38 | 10 | 8 | 10 |
| | VI niaD(-) (исходный) | VI niaD(-) | <1 | 68 | 15 | 6 | 10 |
| | | VI niaD(-)* | <1 | 69 | 14 | 4 | 12 |

* ФП получены на среде с содержанием МКЦ 4 % масс., данные получены в рамках работы [163].

Снижение содержания МКЦ в культивационной среде при получении ФП с 4 до 2 % для гриба *Penicillium verruculosum* не оказало негативного влияния на состав и основные ферментативные активности получаемых на его основе ФП. Так, содержание пектинлиазы в ФП VI 7.7, полученном с использованием среды с пониженным содержанием целлюлозы, изменилось не более чем на 2 % в сравнении с ФП на основе штамма *P. verruculosum* PB7, культивируемого на ранее используемой среде [162].

4.2 Свойства используемых в работе коммерческих ферментных препаратов

В наших исследованиях мы использовали также коммерческие ФП, специально разработанные для применения в виноделии. Ниже представлена электрофореграмма этих ФП (рисунок 5), позволяющая предположить характер ферментов, входящих в их состав.

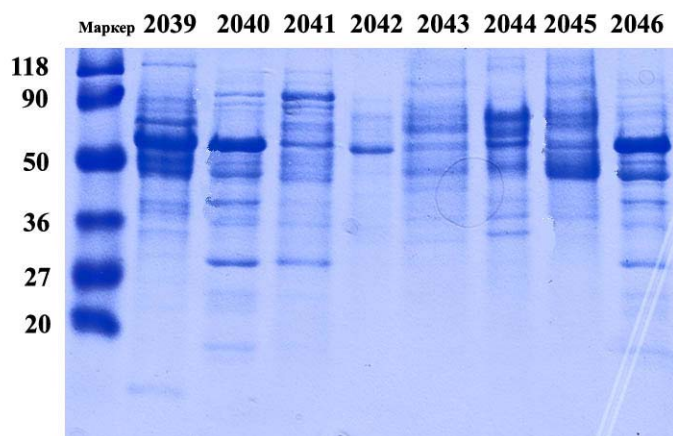


Рисунок 5 - Электрофореграмма
используемых в работе
коммерческих ФП.

В таблице 6 приведены функции каждого препарата, заявленные производителем, а также представлены основные активности по отношению к различным субстратам, обнаруженные в их составе, и содержание в препаратах белка.

Таблица 6 - Основные ферментативные активности используемых в работе коммерческих ФП и содержание в них белка.

| Номер | Описание (Название препарата и назначение) | Белок, мг/г(мл) препарата | Активность, ед/мг белка | | | | | |
|-------|--|---------------------------------|-------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------|
| | | | Ксиланазная | β- глюкозидазная | Целлюлазная (КМЦ) | Целлюлазная (МКЦ) | Полигалакту- роная | Пектинлиазная |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 2039 | <i>Тренолин маш ДФ</i> , оптимизация извлечения полезных компонентов из мезги белых сортов винограда | 33,0±5 | 1,76±0,11 | 0,08±0,01 | 1,2±0,1 | 0,05±0,01 | 11,1±1,2 | 0,30±0,03 |
| 2040 | <i>Тренолин Букет ДФ</i> , освобождение терпенов из мезги белых сортов винограда | 74,0±9 | 4,1±0,3 | 0,75±0,08 | 6,4±0,5 | 0,11±0,01 | 4,4±0,3 | 0,05±0,01 |
| 2041 | <i>Тренолин Фильтро ДФ</i> , оклейка и фильтрация (разрушение коллоидов) | 23,0±3,5 | 4,02±0,28 | 0,82±0,09 | 3,2±0,3 | 0,06±0,01 | 5,5±0,3 | 0,09±0,01 |
| 2042 | <i>Тренолин термо ДФ</i> , оптимизация процесса получения экстрактивных веществ ягод, разрушение пектинов и коллоидов | 43,0±4,3 | 1,56±0,07 | - | 2,3±0,3 | 0,09±0,01 | 7,3±0,5 | 0,34±0,03 |

Продолжение таблицы 6.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| 2043 | <i>Тренолин Опти ДФ</i> , экстракция красящих и ароматобразующих веществ, улучшение прессуемости, увеличение выхода сока | 56,0±8,5 | 0,90±0,06 | 0,12±0,01 | 1,20±0,09 | - | 62,2±4,9 | 0,66±0,05 |
| 2044 | <i>Тренолин Супер ДФ</i> , увеличение выхода сока, улучшение процессов фильтрации, оклеивания | 4,0±0,6 | 1,5±0,1 | 0,07±0,01 | 3,6±0,2 | 0,07±0,01 | 36,7±2,6 | 0,90±0,05 |
| 2045 | <i>Тренолин Колор ДФ</i> , освобождение красящих веществ и доли стабилизирующих цвет компонентов виноградной ягоды | 40,0±6 | 0,51±0,04 | 0,06±0,01 | 1,10±0,06 | 0,02±0,01 | 31,2±2,9 | 0,72±0,06 |
| 2046 | <i>Тренолин Руж ДФ</i> , освобождение из мезги красных сортов винограда красящих и дубильных веществ | 52,0±7,8 | 5,2±0,4 | 0,45±0,05 | 2,8±0,3 | 0,06±0,01 | 4,4±0,3 | 0,11±0,01 |

Анализируя данные таблицы 6, видно, что содержание общего белка и, соответственно, значение единиц ферментативной активности в 1г (мл) каждого из коммерческих ФП значительно ниже в сравнении с лабораторными ФП, что влечет за собой повышенный расход коммерческих ФП при равном уровне дозирования по белку.

Все используемые в работе коммерческие пектиназные ФП характеризовались высокой полигалактуронозной активностью, наибольшие значения которой наблюдали у ФП «Опти ДФ» (2043), «Супер ДФ» (2044) и «Колор ДФ» (2045), которые также обладали и наибольшей пектинлиазной активностью. В ФП «Букет ДФ» (2040), «Фильтро ДФ» (2041) и «Руж ДФ» (2046) ярко выражены β -глюкозидазная, ксиланазная и целлюлазная (КМЦ) активности. Уровень содержания белка во всех коммерческих ФП был значительно ниже по сравнению с таковым для полученных нами лабораторных ФП, что повлекло повышенный расход коммерческих ФП при равном уровне их дозирования по белку с полученными нами ФП.

Из представленных выше данных видно, что изучаемые лабораторные и коммерческие ФП схожи наличием в них пектинлиазной и β -глюкозидазной активностей, но соотношение их в составе ФП различно. Так как коммерческие ФП, в которых данные активности – определяющие, направлены на освобождение из кожицы ягод винограда красящих и дубильных веществ, а также на разрушение пектинов и облегчение прессуемости виноградной мезги, можно предположить, что лабораторные ФП в перспективе способны выполнять те же функции с большей эффективностью за счет своего сбалансированного состава.

ГЛАВА 5 РЕЗУЛЬТАТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Целью экспериментов по переработке растительного сырья (плодов и винограда) стало выявление субстратной специфичности лабораторных ФП, сравнение их гидролитической способности с коммерческими аналогами (обработка винограда), применяемыми в традиционном виноделии, определение оптимальных условий ферментативной обработки, которые позволили бы получить продукт с высокими органолептическими показателями.

Обработку плодового сырья и винограда с помощью ФП проводили в малых объемах в стандартных условиях, ФП вносили в трех дозировках, наиболее часто используемых в производстве: 0,02; 0,03 и 0,05 % от массы осаживаемого субстрата [163].

Виноград поступал для переработки в деревянных ящиках свежим, в то время, как плодое сырье хранилось до начала экспериментов в замороженном виде. Плоды размораживали, из сливы удаляли косточки, далее сырье измельчали, в мезге определяли содержание титруемых кислот. Сливу нагревали до 50 °С с целью улучшения ароматических качеств продукта. Затем рассчитывали необходимое разбавление для каждой из проб плодового сырья, количество вносимого буферного раствора, воды, антибиотика и ФП. Разбавление пробы выбирали в соответствии с начальной титруемой кислотностью субстрата. Пробы винограда технических сортов разбавлению не подвергались. Для рябины и черной смородины варьировали температуру гидролиза, определяя режим обработки, не влияющий отрицательно на органолептические характеристики соков. В полученных гидролизатах определяли содержание ВС, глюкозы, выход сока через складчатый фильтр.

5.1 Результаты ферментативной обработки плодового сырья

Влияние обработки плодового сырья ФП на выход сока

Важным показателем эффективности обработки сырья ФП стало увеличение выхода самотечных, наиболее ценных, фракций сока из мезги после 48 часов гидролиза (таблица 7).

Таблица 7 - Выход самотечных фракций сока после 48 часов обработки плодового сырья ФП. Цветом выделен наибольший выход сока для каждой пробы.

| Условия проведения обработки | Используемые ферментные препараты | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|-------|----------|-------|------------|-------|-------------------|-------|
| | VI 7.4 | | VI 7.7 | | VI niaD(-) | | Контроль (без ФП) | |
| <i>1</i> | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>4</i> | | <i>5</i> | |
| Субстрат | Сортовая рябина «Красавица» | | | | | | | |
| Температурный режим обработки | 50 °С | 30 °С | 50 °С | 30 °С | 50 °С | 30 °С | 50 °С | 30 °С |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | | | | | |

Продолжение таблицы 7.

| 1 | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0,02 | 5,6 | 5,5 | 6,3 | 6,2 | 5,4 | 5,3 | 1,5 | 1,3 |
| 0,03 | 5,8 | 5,8 | 6,5 | 6,5 | 5,6 | 5,5 | | |
| 0,05 | 6,3 | 6,1 | 6,6 | 6,5 | 5,7 | 5,6 | | |
| Субстрат | Слива «Желтая Хопты» | | | | | | | |
| Температурный режим обработки | 50 °С* | | | | | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | | | | | |
| 0,02 | 6,3 | | 5,2 | | 4,6 | | 0,5 | |
| 0,03 | 6,5 | | 5,7 | | 4,8 | | | |
| 0,05 | 6,5 | | 5,9 | | 5,0 | | | |
| Субстрат | Черная смородина | | | | | | | |
| Температурный режим обработки | 50 °С | 30 °С | 50 °С | 30 °С | 50 °С | 30 °С | 50 °С | 30 °С |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | | | | | |
| 0,02 | 4,3 | 4,1 | 4 | 3,8 | 3,9 | 3,7 | 1,2 | 1,1 |
| 0,03 | 4,5 | 4,4 | 4,1 | 4,1 | 4 | 3,9 | | |
| 0,05 | 4,6 | 4,5 | 4,3 | 4,2 | 4,2 | 4,0 | | |

Границы погрешности результатов однократных измерений устанавливали, исходя из точности средства измерения (мерного цилиндра): $\pm 0,1$ мл.

* - данный режим был выбран вследствие невозможности переработки (эффективного экстрагирования) субстрата при более низких температурах.

При использовании равных дозировок ФП (по белку) наибольший выход сока из рябины достигали обработкой лабораторным ФП ВІ 7.7, для сливы и черной смородины наибольший выход сока обеспечивал ФП ВІ 7.4. Данные препараты, полученные с помощью рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* РВ4 и РВ7, характеризуются наличием в составе ЦБГ I и II, β -глюкозидазы и пектинлиазы А.

Можно отметить небольшое негативное влияние на выход сока изменения температурного режима обработки рябины и смородины с 50 °С до 30 °С, необходимость которого будет далее пояснена. Как видно из таблицы 7, наибольшая разница в выходе самотечной фракции сула между опытными и контрольными образцами достигалась обработкой сливы ФП ВІ 7.4 – выход самотечной фракции возрастает более чем в 10 раз в сравнении с контрольной пробой без ФП.

Выход сока из мезги, обработанной меньшим количеством ФП (0,02-0,03 % от массы субстрата) критически не отличался.

Влияние обработки плодового сырья ФП на выход сахаров

Гидролитическую способность используемых ФП по отношению к плодovому сырью оценивали также путем измерения содержания в пробах ВС и глюкозы. Увеличение

концентрации ВС свидетельствует о степени гидролиза полисахаридов сырья (гемицеллюлоз, целлюлозы); рост содержания в пробах глюкозы - о степени гидролиза целлюлозы.

Ниже приведены результаты накопления ВС и глюкозы в пробах плодовых субстратов за 3, 24 и 48 часов ферментативной обработки при внесении ФП в различных дозировках. Рисунки 6-8 иллюстрируют гидролитическую способность лабораторных ФП VI 7.4, VI 7.7 и VI niaD(-) (ФП, полученный с помощью штамма-реципиента) по отношению к сортовой рябине «Красавица». На рисунке 9 представлено содержание ВС и глюкозы в гидролизатах рябины относительно фона (контрольного образца, в который не вносили ФП) после 48 часов гидролиза. Показатели ВС и глюкозы контрольного образца, полученного без применения ФП, пересекаются на рисунке с осью *x*.

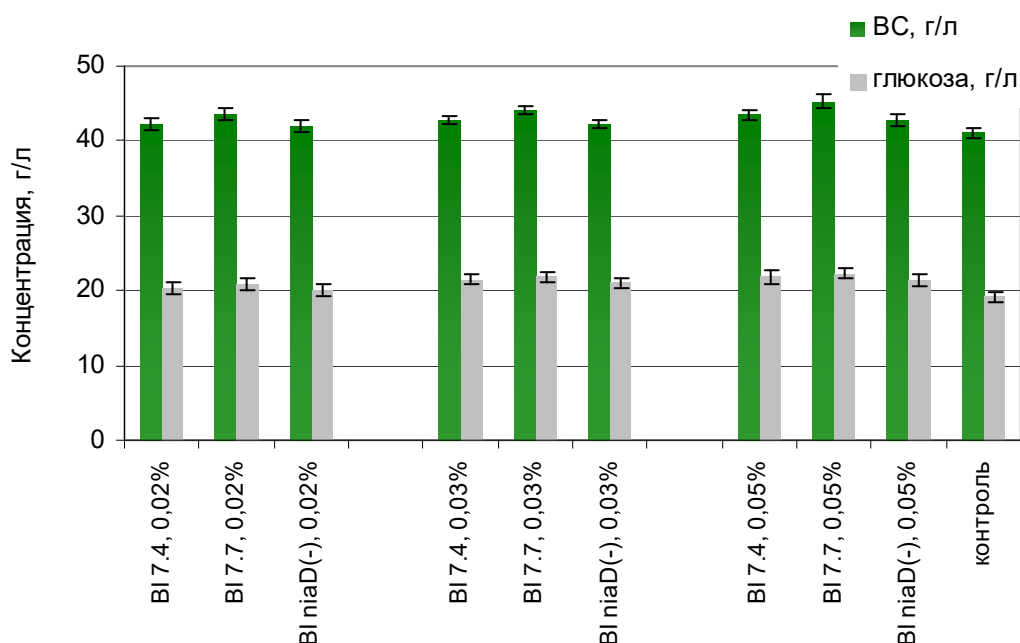


Рисунок 6 - Содержание в гидролизатах сортовой рябины ВС и глюкозы через 3 часа ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

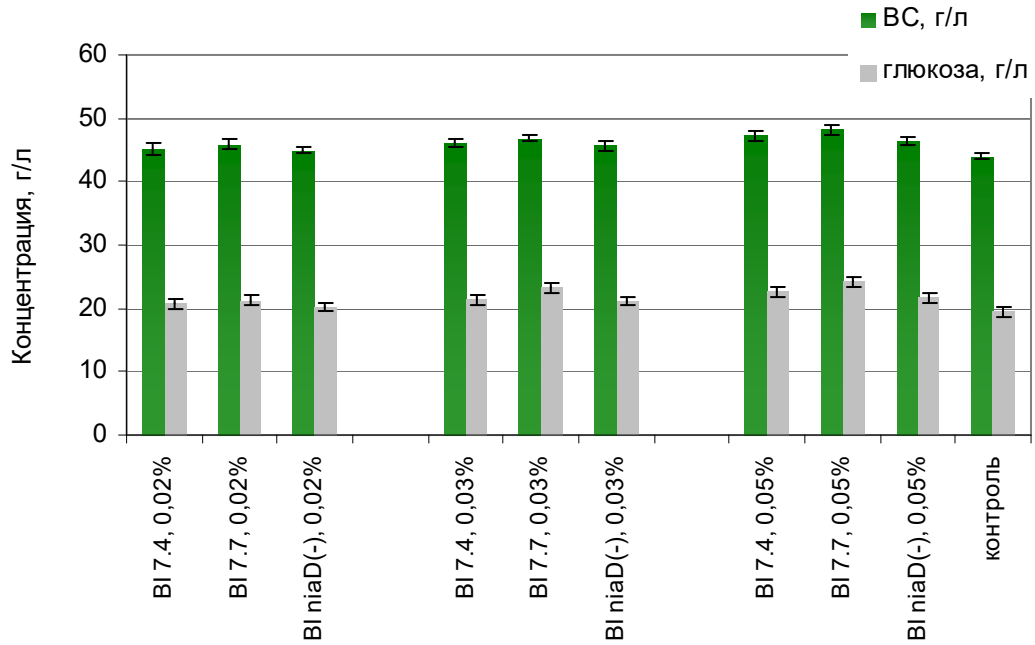


Рисунок 7 - Содержание в гидролизатах сортовой рябины ВС и глюкозы через 24 часа ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

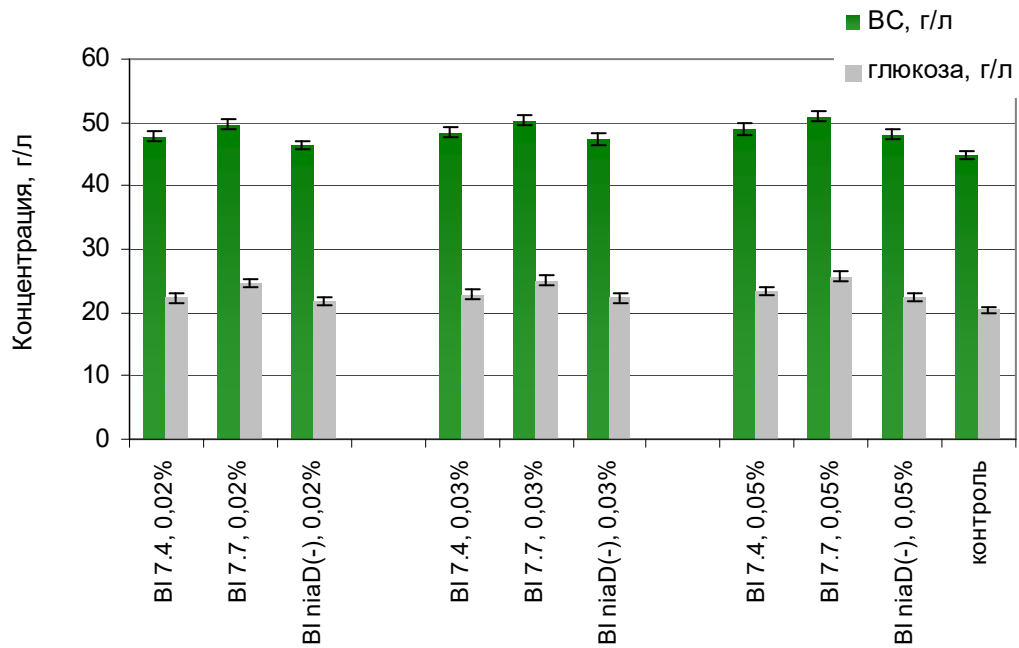


Рисунок 8 - Содержание в гидролизатах сортовой рябины ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

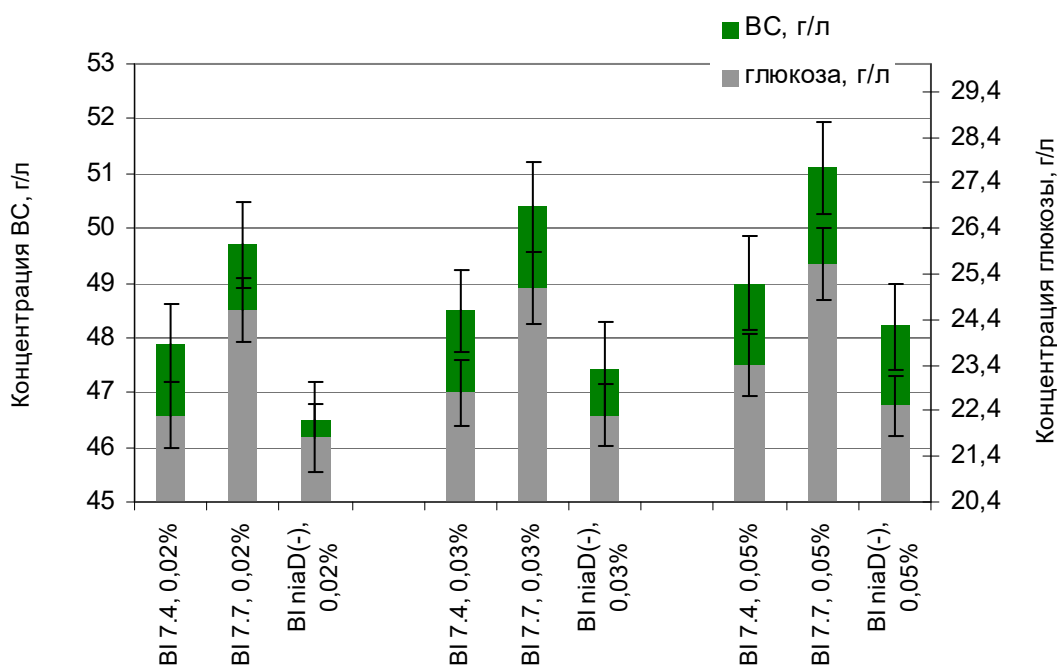


Рисунок 9 - Изменение содержания в гидролизатах сортовой рябины ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья) относительно контрольного образца.

В процессе обработки рябины при 50 °С было отмечено негативное влияние на субстрат повышенной температуры, а именно изменение цвета самотечной фракции сока из субстрата по завершении гидролиза (через 48 часов), поэтому температура ферментативной обработки сортовой рябины была снижена до 30 °С. Результаты повторного проведения ферментативной обработки рябины при этой температуре проиллюстрированы в работе на рисунке 10 и дают возможность оценить снижение гидролитической способности ФП, вызванное изменением температуры обработки.

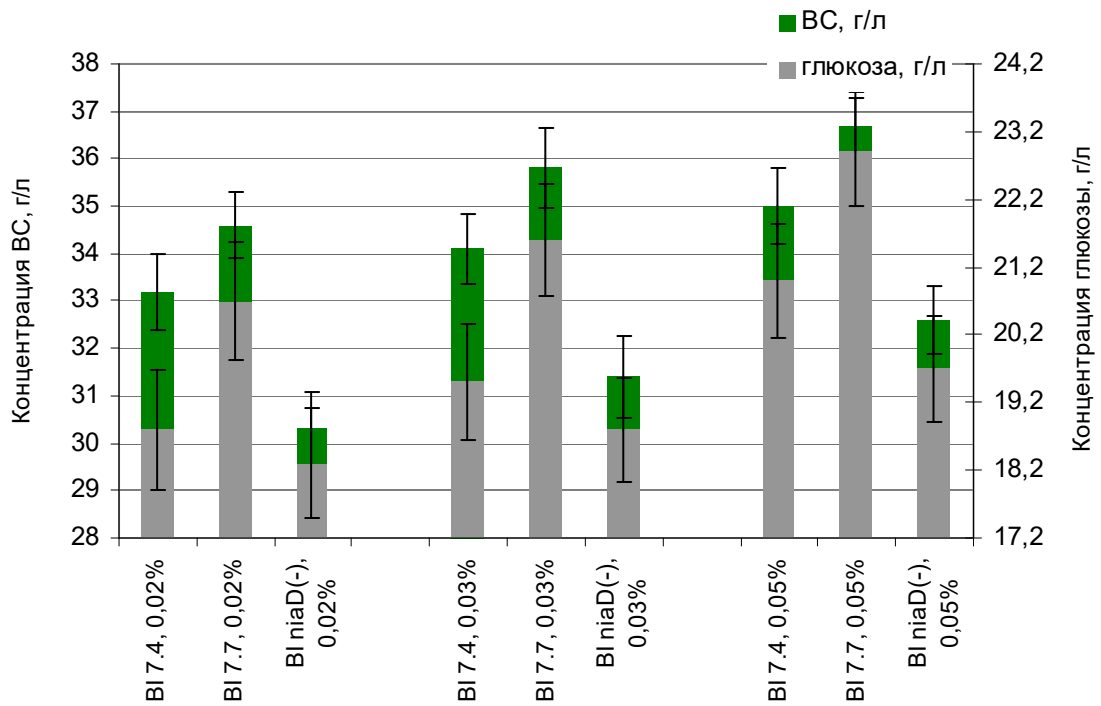


Рисунок 10 - Изменение содержания в гидролизатах сортовой рябины ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 30 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья) относительно контрольного образца.

Понижение температуры гидролиза с 50 до 30 °С снизило выход ВС и глюкозы из субстрата в среднем на 30-40 %, тем не менее, изменения температурного режима обработки в этом случае оправдано сохранением качества продукта, поскольку позволило сохранить цвет сока (рисунок 11).



Рисунок 11 - Изменение цветности сока из рябины в зависимости от температуры ферментативной обработки. 1. – 30 °С; 2. – 50 °С.

Полученные результаты гидролиза выявили наиболее эффективный ФП для обработки рябины с точки зрения накопления в соке сахаров: таким ФП является VI 7.7, в составе которого, наряду с пектинлиазной и β -глюкозидазной, преобладает ксиланазная и целлюлазные активности. Наиболее приемлемая длительность ферментативной обработки плодовой мезги (согласно данным рисунков 6-8) 24 часа. Этого временного интервала достаточно для высвобождения ВС и глюкозы из субстрата.

В случае проведения процесса ферментативного гидролиза черной смородины при 50 °С наблюдали значительное изменение цвета сока - от темно-красного, бордового к красно-коричневому и, кроме того, проявление признаков температурной обработки в аромате. Поэтому обработку черной смородины лабораторными ФП VI 7.4, VI 7.7 и VI niaD(-) проводили как при 50 °С, так и при 30 °С, принимая последний температурный режим за оптимальный (рисунки 12-15).

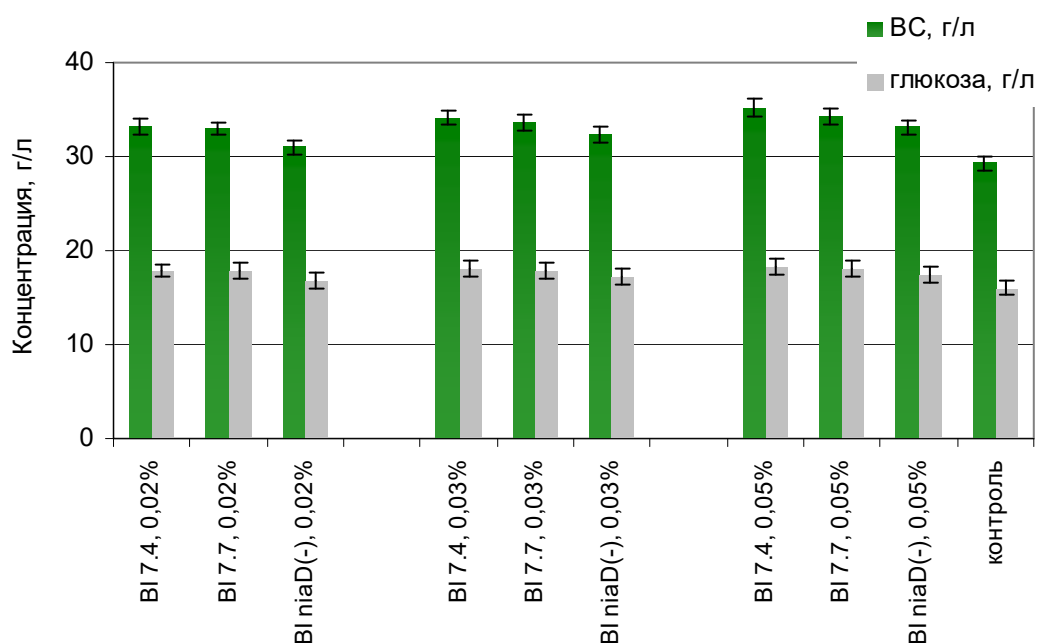


Рисунок 12 - Содержание в гидролизатах черной смородины ВС и глюкозы через 3 часа ферментативной обработки при 30 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

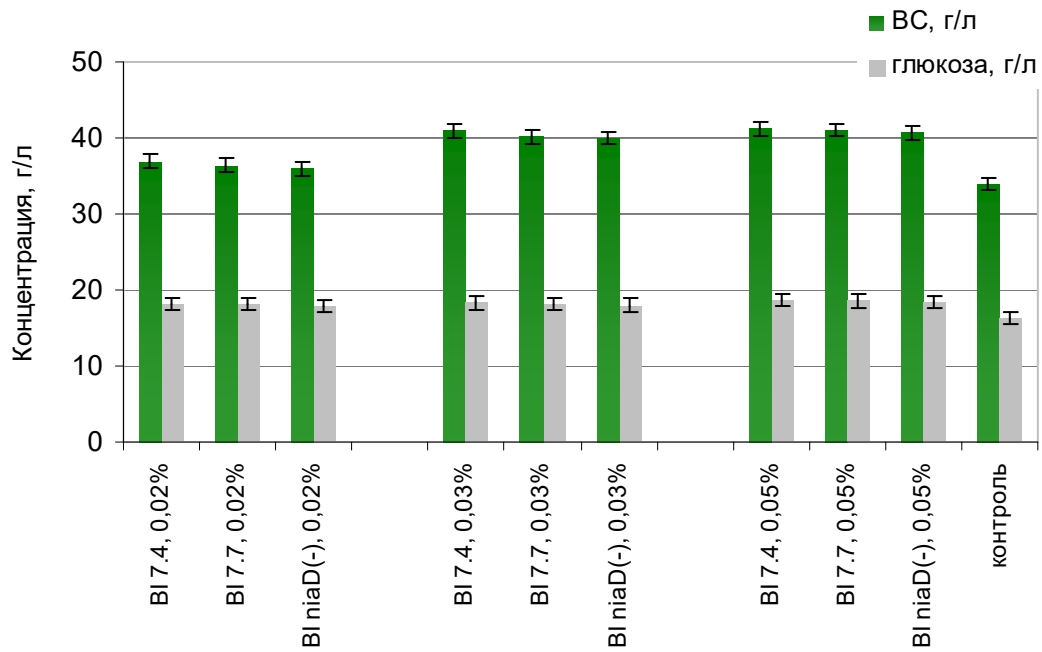


Рисунок 13 - Содержание в гидролизатах черной смородины ВС и глюкозы через 24 часа ферментативной обработки при 30 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

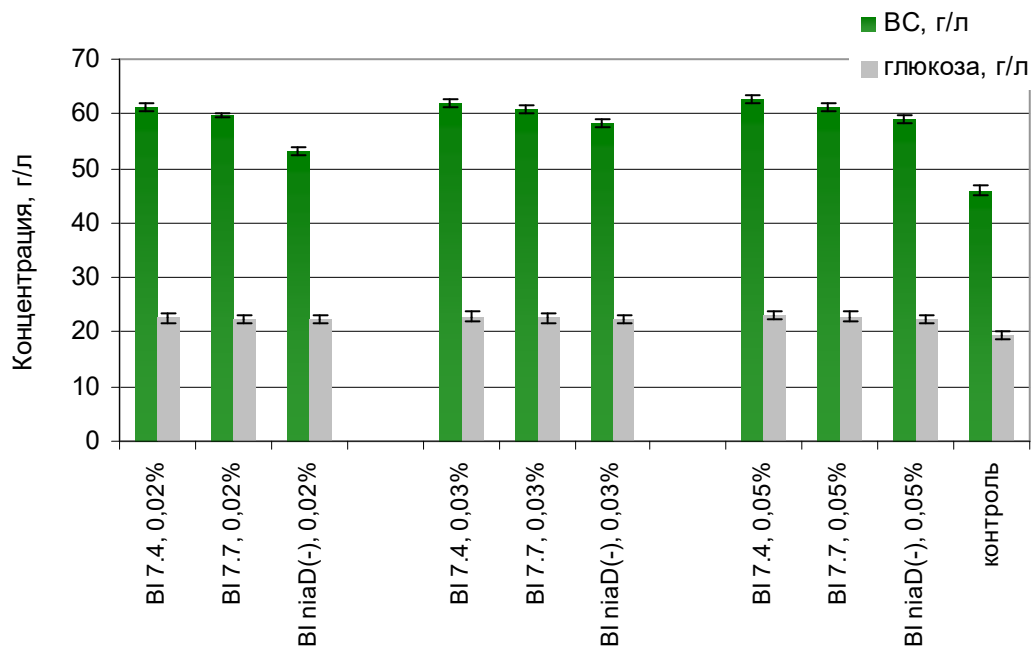


Рисунок 14 - Содержание в гидролизатах черной смородины ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 30 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

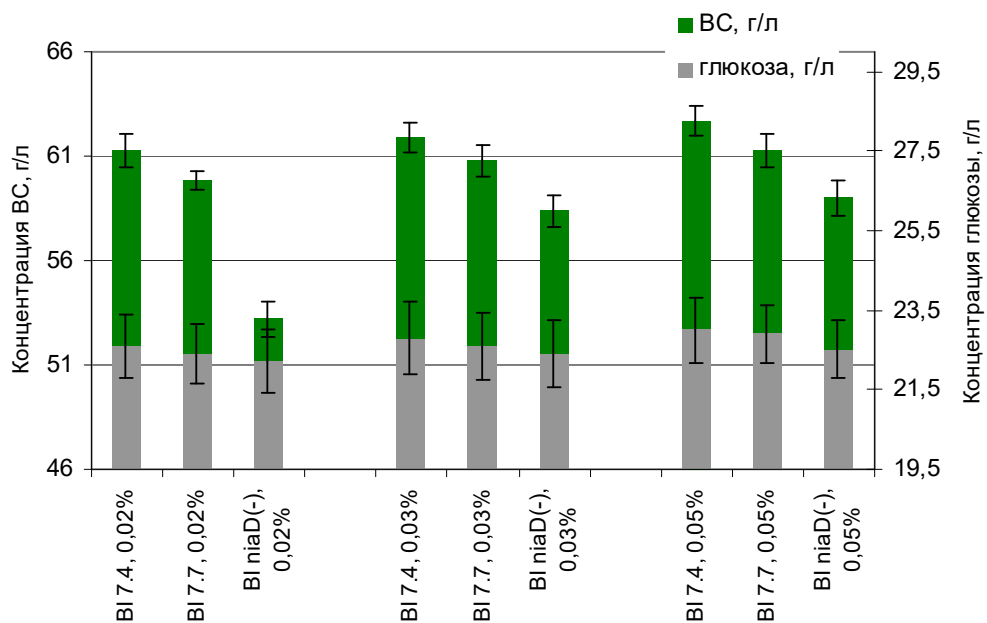


Рисунок 15 - Изменение содержания в гидролизатах черной смородины ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 30 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья) относительно контрольного образца.

Отметим, что повышение температуры в случае обработки черной смородины также интенсифицирует действие ферментов, чем обусловлено большее количество ВС и глюкозы в образцах гидролизатов, полученных при 50 °С (рисунок 16).

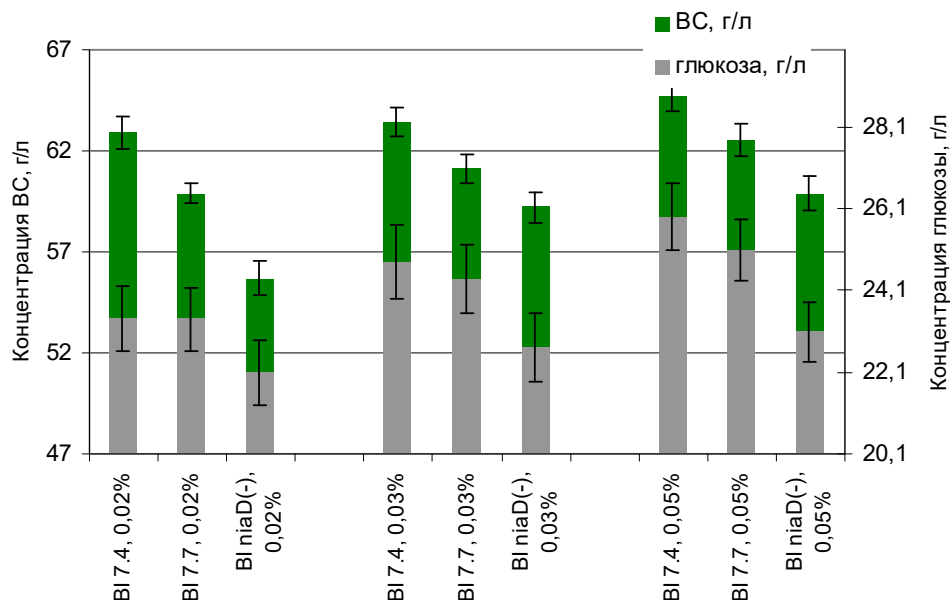


Рисунок 16 - Изменение содержания в гидролизатах черной смородины ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья) относительно контрольного образца.

Для черной смородины оптимальным препаратом, обеспечивающим наибольший выход ВС и глюкозы, можно считать ВІ 7.4. Наиболее приемлемое время гидролиза черной смородины – 24 часа (разница в накоплении ВС и глюкозы между образцами, полученными после 24 и 48 часов обработки, незначительна).

Результаты ферментативного гидролиза с помощью ФП ВІ 7.4, ВІ 7.7 и ВІ niaD(-) желтой сливы при 50 °С представлены на рисунках 17-20. Температура гидролиза 50 °С в данном случае продиктована спецификой субстрата, обработка которого при более низких температурах не позволяет выделить жидкую фракцию (сусло), пригодную для производства фруктовых вин.

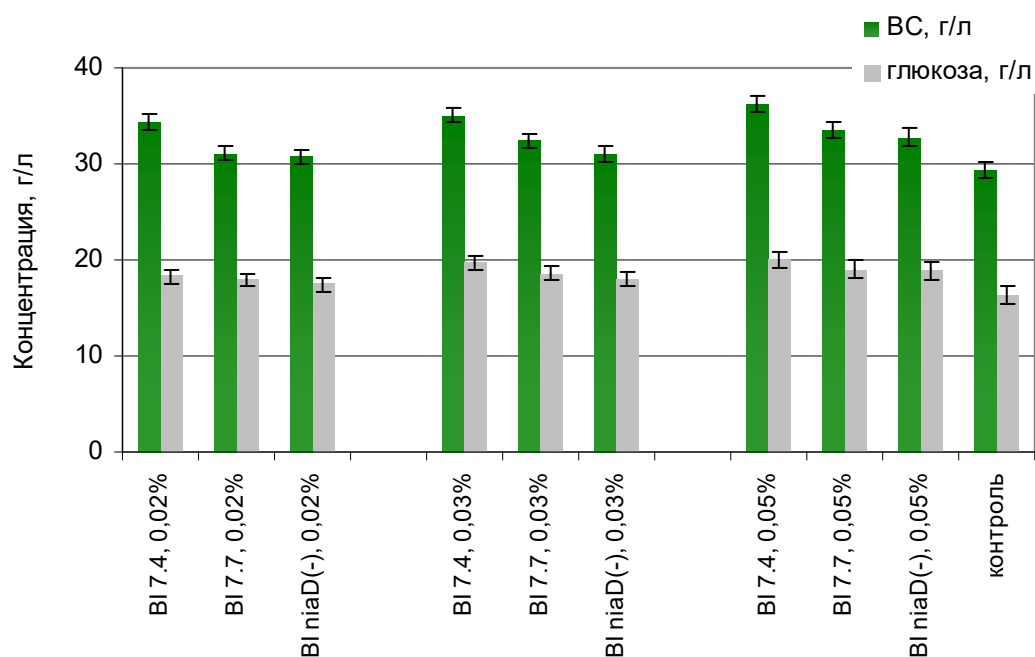


Рисунок 17 - Содержание в гидролизатах желтой сливы ВС и глюкозы через 3 часа ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

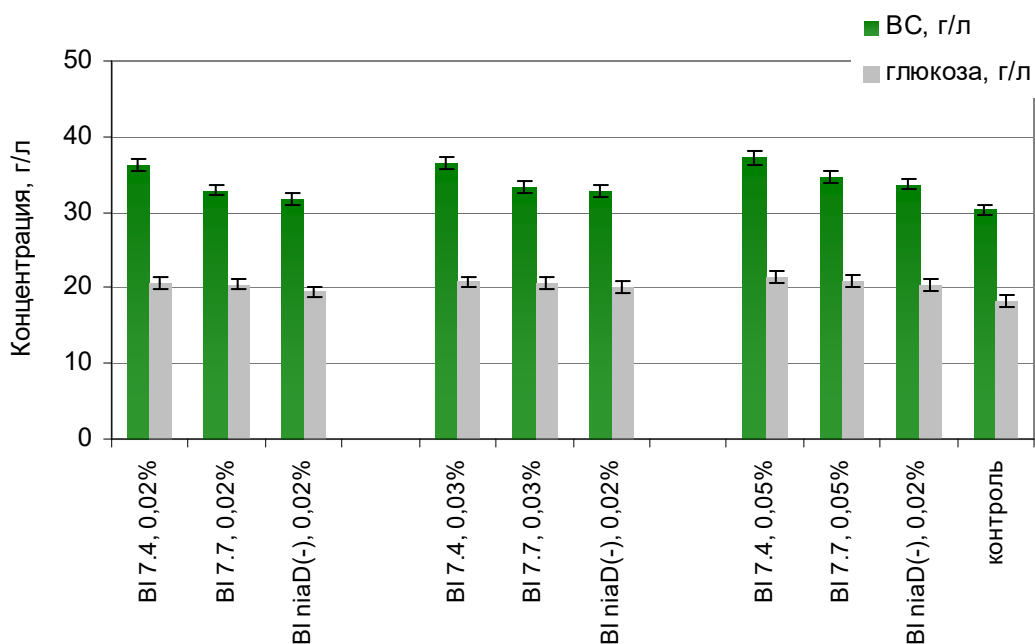


Рисунок 18 - Содержание в гидролизатах желтой сливы ВС и глюкозы через 24 часа ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

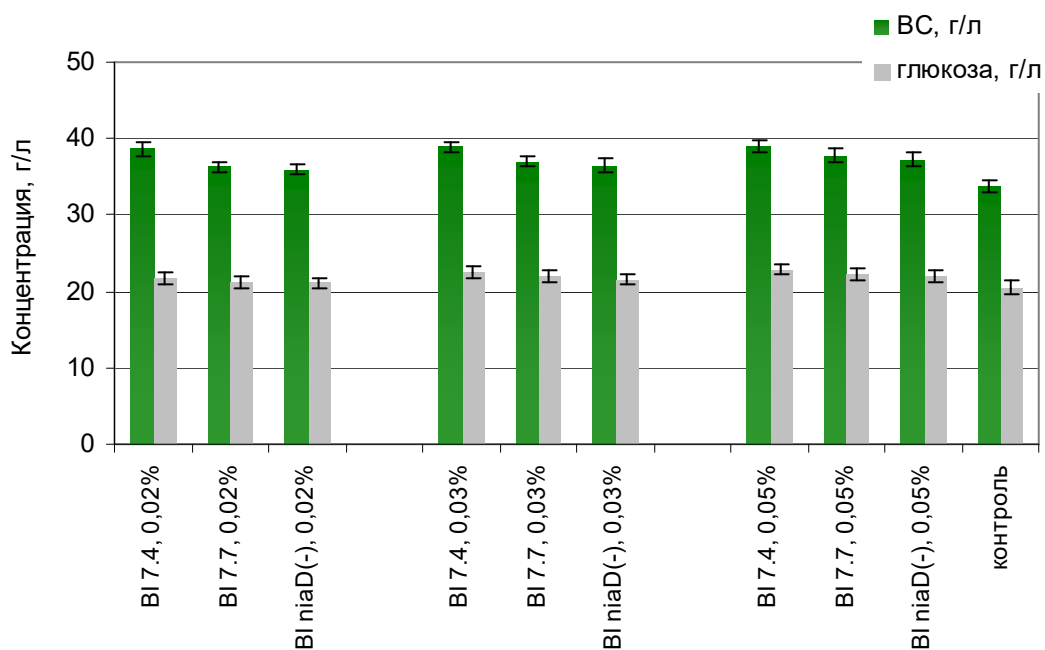


Рисунок 19 - Содержание в гидролизатах желтой сливы ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

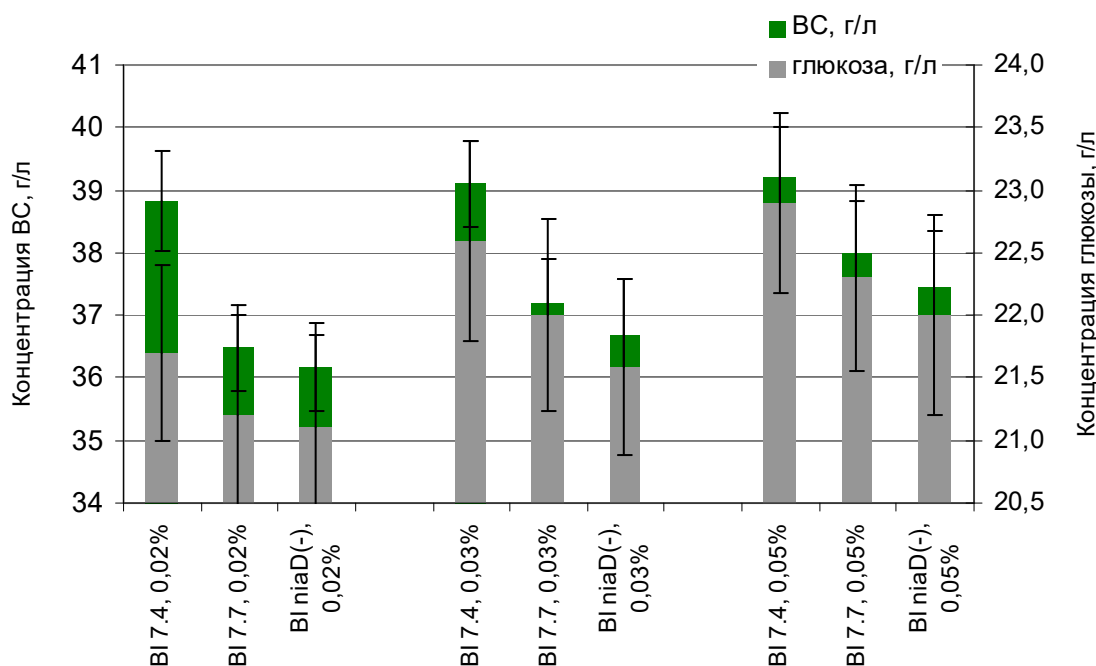


Рисунок 20 - Изменение содержания в гидролизатах желтой сливы ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 50 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья) относительно контрольного образца.

Исходя из приведенных выше данных, наиболее подходящий ФП для обработки сливы – BI 7.4, он способствует увеличению содержания ВС в соке на 15 %. Приемлемым временем проведения гидролиза можно считать 24 часа, по прошествии этого времени удалось получить сусли с насыщенным сливовым ароматом и повышенным содержанием ВС и глюкозы относительно контрольного образца сусли.

Таким образом, проведение обработки плодового сырья (рябины, черной смородины, желтой сливы) с использованием в работе лабораторных ФП приводит к следующим результатам:

- прирост ВС и глюкозы в гидролизатах по сравнению с контрольным образцом (без обработки ФП) составляет 10-20 %;
- оптимальной дозировкой ФП с точки зрения достижения максимального содержания ВС и глюкозы в гидролизатах являются 0,02 и 0,03 % от массы субстрата;
- оптимальное время экспозиции используемой плодовой и ягодной мезги в присутствии ФП – 24 часа;
- температурные режимы для проведения обработки ФП: для рябины и черной смородины 30 °С, для желтой сливы – 50 °С;

- эффективность действия на субстраты ФП, полученного с помощью исходного штамма *P. verruculosum* VI niaD(-), уступает показателям препаратов, полученных из генетически модифицированных штаммов;
- с учетом выхода сока и содержания в нем сахаров оптимальным для обработки рябины является ФП VI 7.7, для обработки сливы и черной смородины - ФП VI 7.4. Это обусловлено тем, что ФП VI 7.4 характерен выраженными β -глюкозидазной и пектинлиазной активностями и позволяет добиться видимого разжижения богатых пектиновыми веществами черной смородины и сливы в короткий срок. ФП VI 7.7 содержит комплекс целлюлаз и гемицеллюлаз, а также пектинлиазу, поэтому состав его ферментного комплекса адаптирован к составу полисахаридного комплекса рябины, обогащенного соответствующими полисахаридами [164].

5.2 Результаты ферментативной обработки технических сортов винограда

Влияние обработки винограда ФП на выход сока

В таблице 8 приведен выход сусла из технических сортов винограда после их обработки лабораторными ФП в течение 48 часов при 20 °С (данный температурный режим способствует сохранению качественных свойств сусла).

Таблица 8 - Выход самотечных фракций сусла после обработки различных технических сортов винограда лабораторными ФП (20 °С, 48 часов). Цветом выделен наибольший выход сусла для каждого образца.

| Условия проведения обработки | Используемые ферментные препараты | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|----------|------------|----------|
| | VI 7.4 | VI 7.7 | VI niaD(-) | Контроль |
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| Субстрат | Виноград сорта «Цимлянский Черный» | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | |
| 0,02 | 4,2 | 6,0 | 4,3 | 3,8 |
| 0,03 | 5,0 | 6,5 | 4,9 | |
| 0,05 | 5,1 | 6,6 | 4,9 | |
| Субстрат | Виноград сорта «Каберне Совиньон» | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | |
| 0,02 | 4,9 | 6,0 | 5,1 | 4,1 |
| 0,03 | 5,4 | 6,7 | 5,0 | |
| 0,05 | 5,5 | 7,1 | 5,2 | |
| Субстрат | Виноград сорта «Изабелла» | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | |
| 0,02 | 4,2 | 6,3 | 4,3 | 3,9 |

Продолжение таблицы 8.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|
| 0,03 | 4,7 | 7,0 | 4,7 | 3,9 |
| 0,05 | 4,8 | 7,4 | 4,7 | |
| Субстрат | Виноград сорта «Ркацители» | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | |
| 0,02 | 5,7 | 6,2 | 5,1 | 4,4 |
| 0,03 | 6,1 | 6,6 | 5,5 | |
| 0,05 | 6,3 | 6,8 | 5,8 | |

Границы погрешности результатов однократных измерений устанавливали, исходя из точности средства измерения (мерного цилиндра): $\pm 0,1$ мл.

Наилучшие результаты по выходу самотечной фракции суслу из всех используемых сортов винограда показал ФП ВІ 7.7, что обусловлено составом входящих в него активностей, среди которых явно выражена ксиланазная, β -глюкозидазная и пектинлиазная. Такой набор ферментативных активностей делает данный ФП «приспособленным» для разжижения пектиново-глюкановых комплексов в составе виноградной мезги и формирования более плотных осадков, что в последующем положительно влияет на процессы фильтрации [165].

В качестве дополнительного контроля проводили ферментацию образцов виноградного сырья коммерческими ФП. В таблице 9 приведены данные, характеризующие действие коммерческих ФП «Термо ДФ» (2042), «Опти ДФ» (2043) и «Супер ДФ» (2044) на выход виноградного суслу из мезги. Выбор именно этих коммерческих ФП основан на направленности их применения, указанной производителем (выход суслу, разрушение коллоидов), см. таблицу 6.

Таблица 9 - Выход самотечных фракций суслу после обработки различных технических сортов винограда коммерческими ФП (20 °С, 48 часов). Цветом выделен наибольший выход суслу для каждого образца.

| Условия проведения обработки | Используемые ферментные препараты | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|------|------|----------|
| | 2042 | 2043 | 2044 | Контроль |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Субстрат | Виноград сорта «Цимлянский Черный» | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | |
| 0,02 | 5,1 | 5,3 | 4,8 | 3,8 |
| 0,03 | 5,4 | 5,7 | 5,0 | |
| 0,05 | 5,5 | 5,8 | 5,1 | |
| Субстрат | Виноград сорта «Каберне Совиньон» | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | |
| 0,02 | 5,4 | 5,5 | 4,8 | 4,1 |

Продолжение таблицы 9.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|-----|
| 0,03 | 5,9 | 5,9 | 5,0 | 4,1 |
| 0,05 | 6,1 | 6,0 | 5,3 | |
| Субстрат | Виноград сорта «Изабелла» | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | |
| 0,02 | 4,1 | 5,3 | 4,1 | 3,9 |
| 0,03 | 4,7 | 5,6 | 4,3 | |
| 0,05 | 4,9 | 5,9 | 4,5 | |
| Субстрат | Виноград сорта «Ркацители» | | | |
| Дозировка ФП (% от массы субстрата) | Выход сока-самотека за 15 минут, мл: | | | |
| 0,02 | 4,6 | 5,2 | 5,4 | 4,4 |
| 0,03 | 4,8 | 5,5 | 5,7 | |
| 0,05 | 4,8 | 5,7 | 6,0 | |

Границы погрешности результатов однократных измерений устанавливали, исходя из точности средства измерения (мерного цилиндра): $\pm 0,1$ мл.

Сходимость полученных результатов обработки виноградной мезги коммерческими ФП говорит о близком компонентном составе данных ФП. Так, обработка любым коммерческим препаратом из использованных помогла достичь увеличения выхода сусла на 30 % относительно контрольных образцов для каждого из используемых сортов винограда.

Отметим, что показатели применения ФП ВІ 7.7, в свою очередь, заметно превосходили показатели использования ФП ВІ 7.4 и ВІ niaD(-), а также используемых коммерческих ФП - увеличение выхода виноградного сусла составляет в случае ФП ВІ 7.7 40 %.

Влияние ФП на выход сахаров из винограда

Гидролитическую способность лабораторных ФП в случае использования винограда в качестве сырья дополнительно сравнивали с действием коммерческих препаратов в равной дозировке (0,03 % от массы сырья) после 48 часов гидролиза. В остальном характер экспериментов с виноградом не отличался от таковых с использованием плодового сырья.

Рисунки 21-24 характеризуют гидролитическую способность исследуемых ФП по отношению к винограду сорта «Цимлянский Черный».

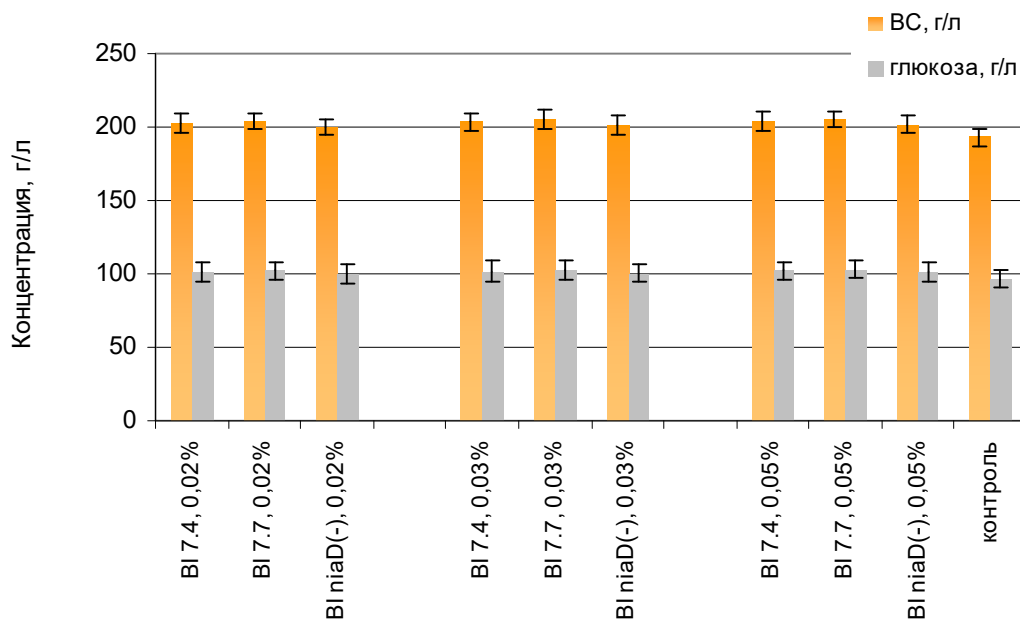


Рисунок 21 - Содержание в гидролизатах винограда «Цимлянский Черный» ВС и глюкозы через 3 часа ферментативной обработки при 20 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

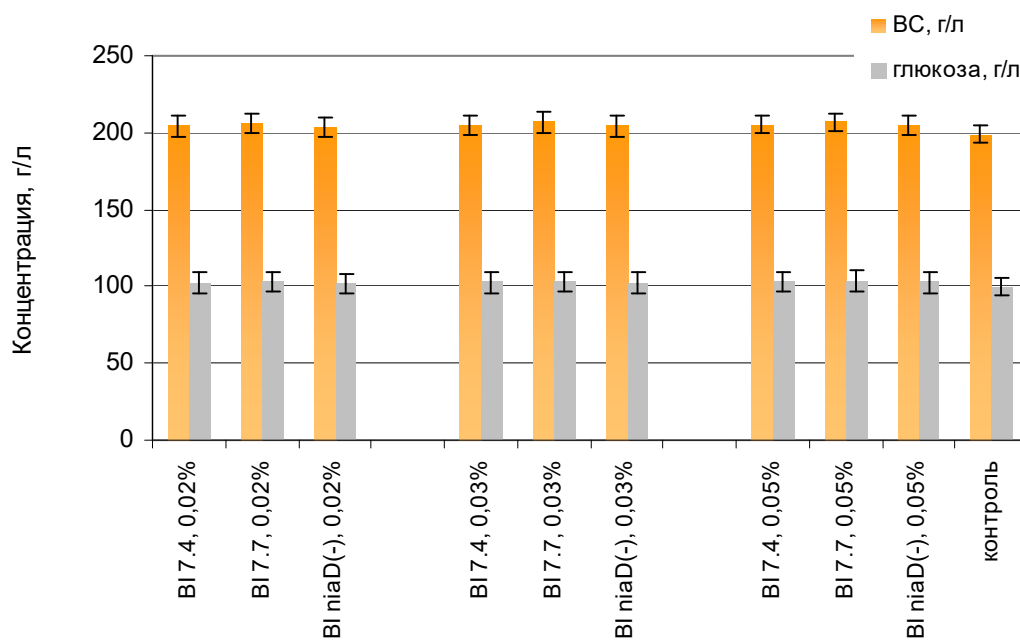


Рисунок 22 - Содержание в гидролизатах винограда «Цимлянский Черный» ВС и глюкозы через 24 часа ферментативной обработки при 20 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

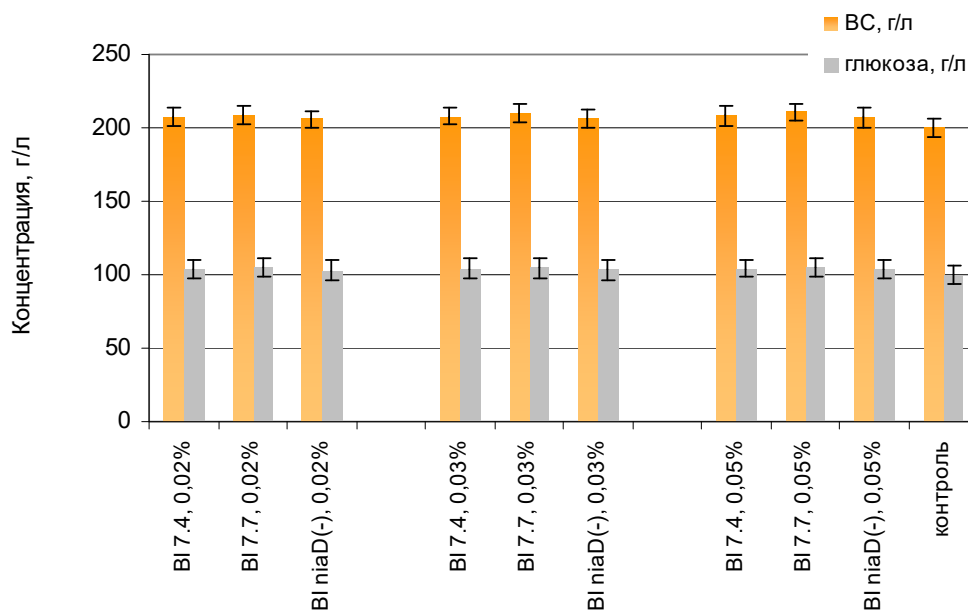


Рисунок 23 - Содержание в гидролизатах винограда «Цимлянский Черный» ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 20 °С в зависимости от дозировки ФП (% от массы сырья).

На рисунке 24 приведены результаты обработки винограда лабораторными ФП в дозировке 0,03 % от массы сырья относительно контрольной пробы, в которую ферментов не вносили. На рисунке также представлены показатели содержания ВС и глюкозы в гидролизатах, обработанных коммерческими ФП при равной дозировке по белку (0,03 % от массы субстрата).

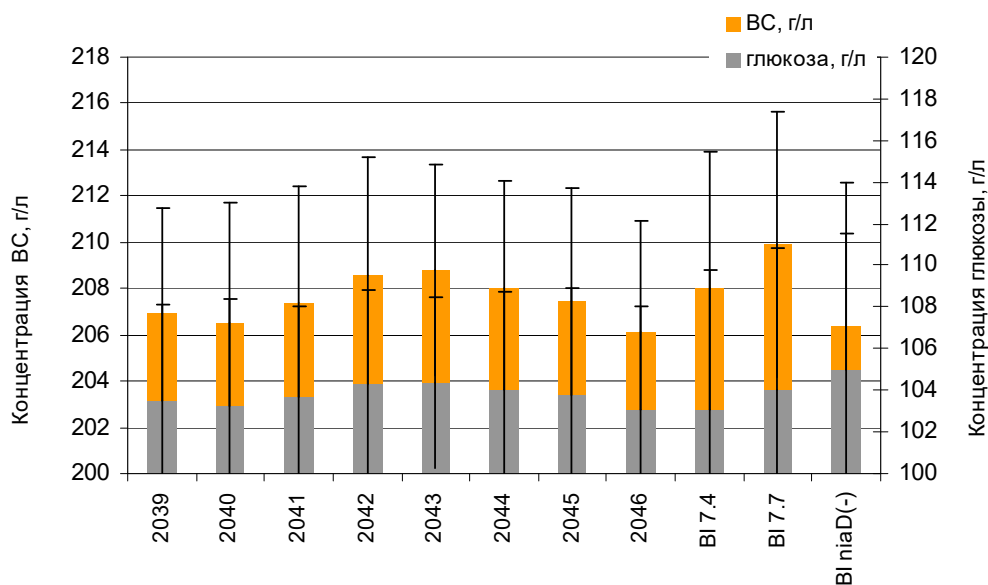


Рисунок 24 - Изменение содержания в гидролизатах винограда «Цимлянский Черный» ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 20 °С в зависимости от применяемого ФП при равной дозировке (0,03 % от массы субстрата) относительно контрольного образца.

Лабораторный ФП ВІ 7.7 превосходил использованные для сравнения коммерческие ФП как с точки зрения выхода самотечных фракций виноградного сусла, так и с точки зрения накопления в сусле сахаров. Такой результат можно объяснить присутствием в ФП ВІ 7.7 пектинлиазы А, способствующей эффективной биоконверсии пектиновых веществ виноградных ягод.

Это подтверждается также результатами, полученными после ферментативной обработки других сортов винограда, используемых в работе. Тем не менее, накопление сахаров в пробах в случае ферментации виноградной мезги не так значительно, как при работе с плодовыми субстратами. Разница в содержании ВС и глюкозы между образцами всех видов виноградной мезги, обработанными различными ФП, невелика и статистически неразличима. Так как уже через 3 часа гидролиза происходит заметное разжижение мезги, время проведения обработки винограда ФП можно подбирать, основываясь на технологических особенностях производства вин.

На рисунках 25-27 приведены данные, характеризующие накопление сахаров в результате воздействия лабораторных и коммерческих ФП в течение 48 часов относительно образца, полученного без применения ФП, на виноград сортов «Каберне Совиньон», «Изабелла» и «Ркацители».

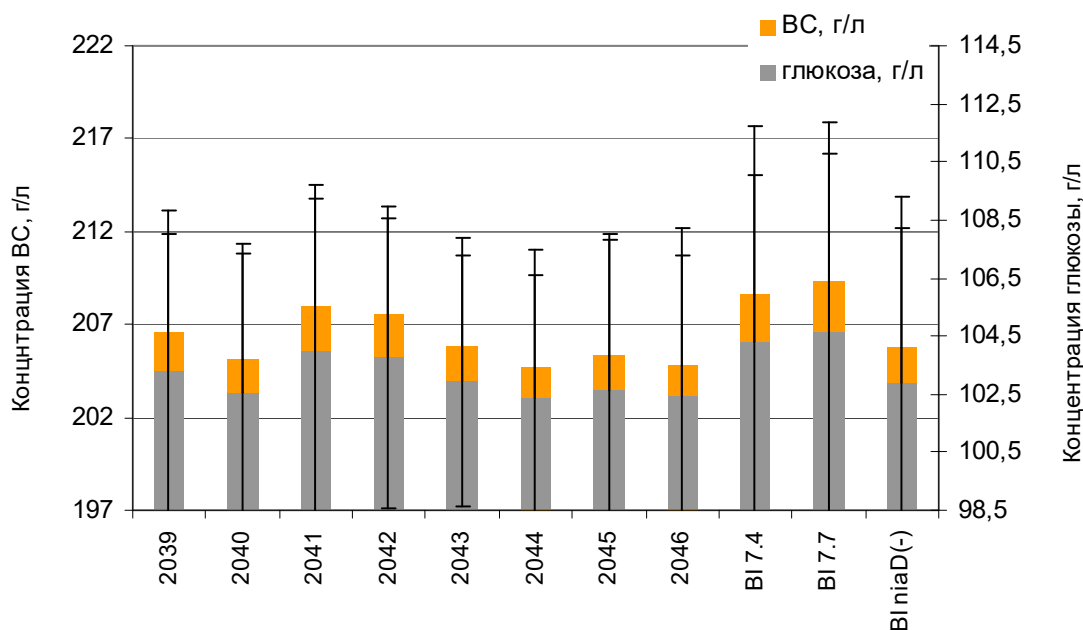


Рисунок 25 - Изменение содержания в гидролизатах винограда «Каберне Совиньон» ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 20 °С в зависимости от применяемого ФП при равной дозировке (0,03 % от массы субстрата) относительно контрольного образца.

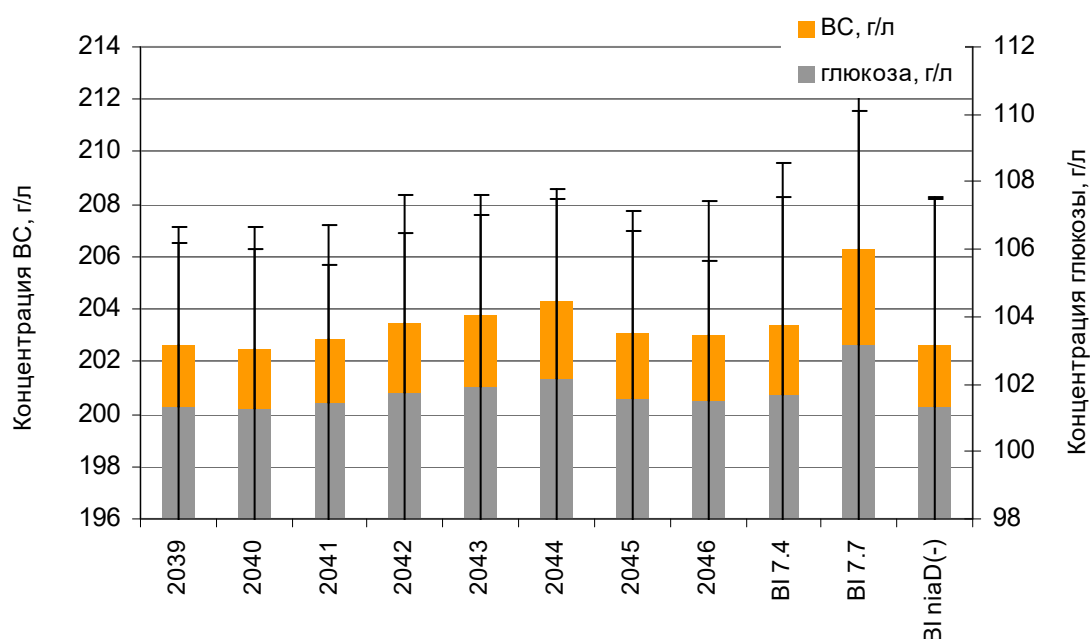


Рисунок 26 - Изменение содержания в гидролизатах винограда «Изабелла» ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 20 °С в зависимости от применяемого ФП при равной дозировке (0,03 % от массы субстрата) относительно контрольного образца.

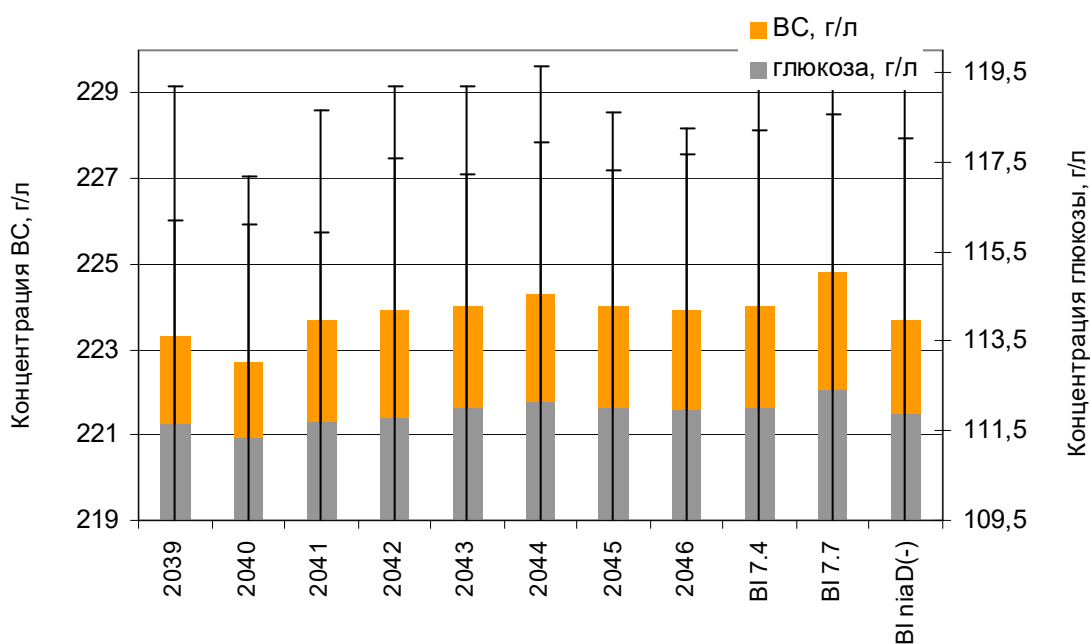


Рисунок 27 - Изменение содержания в гидролизатах винограда «Ркацители» ВС и глюкозы через 48 часов ферментативной обработки при 20 °С в зависимости от применяемого ФП при равной дозировке (0,03 % от массы субстрата) относительно контрольного образца.

Исходя из совокупности результатов, полученных при изучении влияния лабораторных ФП на выход сока и сахаров из виноградного сырья, наиболее подходящий ФП для обработки

всех используемых сортов винограда – ВІ 7.7. Этот препарат способствовал увеличению содержания ВС в виноградном сусле (в среднем на 5-8 % относительно контрольной пробы без фермента), а также значительному увеличению выхода сусла из мезги.

Таким образом, проведение обработки винограда используемыми в работе лабораторными ФП позволяет заключить, что:

- дозировка ФП, способная обеспечить высокий прирост самотечной фракции сусла, составляет 0,03 % от массы сырья;
- наиболее эффективным в применении показал себя ФП ВІ 7.7, так как соотношение его активностей в большей степени соответствует необходимому для полной биоконверсии полисахаридов винограда;
- уже через 3 часа ферментативной обработки заметно положительное влияние ФП на выход виноградного сусла из мезги. Таким образом, время обработки сусла перед началом брожения лимитируется только технологическими особенностями производства столовых вин;
- температурный режим ферментативной обработки 20 °С обеспечивает получение сусла в больших объемах, чем из контрольного образца мезги.

Эффективность применения лабораторного ФП ВІ 7.7 превосходит таковую для коммерческих ФП, используемых в работе с точки зрения выхода сусла из мезги (в среднем на 12 %) и накопления в сусле сахаров (незначительно). Представленный результат, вероятно, связан с более сбалансированным компонентным составом ФП ВІ 7.7 относительно коммерческих аналогов. Сопоставление данных, приведенных в таблицах 4 и 6, свидетельствует о том, что удельная пектинлиазная активность ФП ВІ 7.7 (ед/мг белка) в 2,3 раза превосходит максимальную среди коммерческих препаратов удельную пектинлиазную активность (ФП «Супер ДФ» (2044) – удельная пектинлиазная активность 0,9 ед/мг белка).

ГЛАВА 6 ИЗГОТОВЛЕНИЕ ФРУКТОВЫХ И ВИНОГРАДНЫХ ВИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

На основе изложенных в предыдущем разделе результатов были составлены технологические схемы изготовления фруктовых вин (таблица 10) с применением лабораторных ФП: сухого фруктового вина (рябина «Красавица») и натуральных некрепленых сладких фруктовых вин (рябина «Красавица», желтая слива, черная смородина). Из технических сортов винограда, в свою очередь, получали красный полусухой виноматериал («Цимлянский Черный»), розовое и белое сухие вина («Изабелла» и «Ркацители» соответственно), розовое полусладкое вино («Каберне Совиньон») – таблица 11. В качестве контрольных образцов получали вина по идентичным схемам, но без внесения ФП. Вторым контролем служили вина, изготовленные с использованием ферментного препарата из реципиентного штамма *P. verruculosum* VI niaD(-).

SO₂ вносили в образцы мезги в виде K₂S₂O₅, растворяя его в небольшом количестве сусла. Подсахаривание плодового сусла осуществляли за счет введения в него 70 % сахарного сиропа. При изготовлении вин использовали дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae* расы XII.

В ходе работы велся контроль выхода самотечных и прессовых фракций сусла из образцов, измеряли вязкость сусла и содержание в нем взвесей. Образцы готовых виноматериалов подвергали физико-химическому анализу, включающему фиксацию основных показателей, контролируемых в соответствии с ГОСТами [166, 167], а также органолептической оценке. По полученным результатам делали выводы о целесообразности использования изучаемых ФП.

Таблица 10 – Основные этапы изготовления фруктовых вин.

| Субстрат/продукт | Технология, включающая ферментативную обработку плодовой мезги | Классическая технология |
|--------------------------------------|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Рябина «Красавица» Сухое вино | 1. Мойка и сортировка сырья | |
| | 2. Измельчение мезги, введение в мезгу воды до содержания титруемых кислот 5 г/дм ³ | |
| | 3. Сульфитация мезги K ₂ S ₂ O ₅ до 80 мг/дм ³ | |
| | 4. Настаивание сусла на мезге в присутствии ФП (0,03 % от массы сырья) в течение 24 часов при 30 °С | 4. Настаивание сусла на мезге в течение 24 часов, при 30 °С |
| | 5. Прессование мезги (лабораторный механический пресс вместимостью 1,5 л) | |

Продолжение таблицы 10.

| 1 | 2 | 3 |
|--|--|---|
| Рябина «Красавица» Сухое вино | 6. Внесение сахара до 22 г/100 мл, сульфитация сусла до 120 мг/дм ³ | |
| | 7. Отстаивание (24 часа, 4 °С), снятие с осадка | |
| | 8. Сбраживание сусла (при 20 °С) до содержания сахаров 1,5 г/100 мл. Азотное питание 0,6 г/дм ³ (NH ₄)H ₂ PO ₄ | |
| | 9. Дображивание (20 °С) в течение 15 дней | |
| | 10. Отстаивание сброженного сусла (24 часа, 4 °С), снятие с осадка | |
| | 11. Фильтрация фруктового виноматериала (при необходимости), хранение в стеклянных бутылках при 4 °С | |
| Желтая слива, рябина «Красавица», черная смородина натуральные некрепленые сладкие вина | 1. Мойка и сортировка сырья | |
| | 2. Измельчение мезги, введение в мезгу воды до содержания титруемых кислот 6,8 г/дм ³ | |
| | 3. Сульфитация мезги (K ₂ S ₂ O ₅) до 80 мг/дм ³ | |
| | 4. Настаивание сусла на мезге в присутствии ФП (0,03 % от массы сырья) при 50 °С для сливы, при 30 °С для рябины и черной смородины в течение 24 часов | 4. Настаивание сусла на мезге при 50 °С для сливы, при 30 °С для рябины и черной смородины в течение 24 часов |
| | 5. Прессование мезги (лабораторный механический пресс вместимостью 1,5 л) | |
| | 6. Введение сахара (сахарный сироп 70 %) до концентрации в сусле 22 г/100 мл, сульфитация (K ₂ S ₂ O ₅) до 120 мг/дм ³ | |
| | 7. Отстаивание (24 часа, 4 °С), снятие с осадка | |
| | 8. Сбраживание сусла (при 20 °С) до содержания сахаров не более 1,5 г/100 мл. Азотное питание 0,6 г/дм ³ (NH ₄)H ₂ PO ₄ | |
| | 9. Введение сахара (сахарный сироп 70 %) до концентрации в сусле 15 г/100 мл, дображивание в течение 30 дней при 20 °С | |
| | 10. Отстаивание (24 часа, 4 °С), снятие с осадка | |
| | 11. Фильтрация виноматериалов (при необходимости), хранение в стеклянных бутылках при 4 °С | |

Таблица 11 – Основные этапы изготовления виноградных столовых вин.

| Субстрат/продукт | Технология, включающая ферментативную обработку виноградной мезги | Классическая технология |
|--|---|--|
| 1 | 2 | 3 |
| «Цимлянский Черный» Красное полусухое вино | 1. Приемка и контроль винограда | |
| | 2. Гребнеотделение (ручное), дробление ягод (измельчитель Tefal MB 4011) | |
| | 3. Сульфитация мезги ($K_2S_2O_5$) до 75 мг/дм^3 | |
| | 4. Настаивание на мезге в течение 3-х часов в присутствии ФП (0,03 % от массы сырья) при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ | 4. Настаивание сусла на мезге в течение 72 часов при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ |
| | 5. Отделение 25 % мезги, получение сладкого сусла (лабораторный пресс), хранение его до окончания брожения | |
| | 6. Брожение основного объема сусла на мезге в течение 5 дней при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ | |
| | 7. Отделение самотечных и прессовых фракций сусла от мезги (лабораторный пресс), направление всех фракций сусла на дальнейшее сбраживание | |
| | 8. Дображивание сусла до содержания в нем сахаров не более $0,5 \text{ г/дм}^3$ | |
| | 9. Купажирование сброженного и сладкого сусла до заданного содержания сахаров в продукте 15 г/дм^3 | |
| | 10. Сульфитация ($K_2S_2O_5$) до 200 мг/дм^3 | |
| | 11. Обработка яичным белком (при необходимости), хранение при $4 \text{ }^\circ\text{C}$ | |
| «Каберне Совиньон» Розовое полусладкое вино | 1. Приемка и контроль винограда | |
| | 2. Гребнеотделение (ручное), дробление ягод (измельчитель Tefal MB 4011) | |
| | 3. Сульфитация мезги ($K_2S_2O_5$) до 75 мг/дм^3 | |
| | 4. Настаивание на мезге в течение 3 часов в присутствии ФП (0,03 % от массы сырья) при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ | 4. Настаивание сусла на мезге в течение 24 часов при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ |

Продолжение таблицы 11.

| 1 | 2 | 3 |
|--|---|---|
| <p>«Каберне Совиньон» Розовое полусладкое вино</p> | <p>5. Отделение самотечных и прессовых фракций сусла от мезги (лабораторный пресс)</p> | |
| | <p>6. Сульфитация сусла до 200 мг/дм³ (K₂S₂O₅), осветление сусла яичным белком (24 часа, 8 °С)</p> | |
| | <p>7. Отделение 25 % сладкого сусла, хранение при 4 °С до окончания брожения</p> | |
| | <p>8. Сбраживание основного объема сусла до содержания в нем сахаров не более 0,5 г/дм³, снятие с дрожжевого осадка</p> | |
| | <p>9. Купажирование сброженного и сладкого сусла до заданного содержания сахаров в продукте 30 г/дм³</p> | |
| | <p>10. Обработка яичным белком (при необходимости), хранение при 4 °С</p> | |
| <p>«Изабелла», «Ркацители» Розовое, белое сухие вина</p> | <p>1. Приемка и контроль винограда</p> | |
| | <p>2. Гребнеотделение (ручное), дробление ягод (измельчитель Tefal MB 4011)</p> | |
| | <p>3. Сульфитация мезги (K₂S₂O₅) до 75 мг/дм³</p> | |
| | <p>4. Настаивание на мезге в течение 1,5 часов («Изабелла») при 20 °С, 1 часа («Ркацители») при 10 °С в присутствии ФП (0,03 % от массы сырья)</p> | <p>4. Настаивание сусла на мезге в течение 6 часов («Изабелла») при 20 °С, 24 часов («Ркацители») при 10 °С</p> |
| | <p>5. Отделение самотечных и прессовых фракций сусла (лаб. пресс)</p> | |
| | <p>6. Сульфитация сусла до 200 мг/дм³ (K₂S₂O₅), осветление яичным белком в течение 24 часов при 8-10 °С</p> | |
| | <p>7. Брожение при 15-20 °С, дображивание в течение 20 дней</p> | |
| | <p>8. Снятие с дрожжевого осадка, хранение при 4 °С</p> | |

В рамках работы вина всех типов изготавливали по технологическим схемам, учитывающим не только выводы, сделанные по завершении ряда экспериментов (выбор наиболее эффективного ФП для каждого из используемых видов сырья, время и температурный режим ферментативной обработки), но и согласующимся с получением продуктов заданного качества.

6.1 Влияние ферментных препаратов на выход самотечных и прессовых фракций сусла, полученных в процессе изготовления фруктовых и виноградных вин

Результаты измерения выхода самотечных и прессовых фракций сусла при изготовлении вин по различным технологиям приведены в таблице 12. Отметим, что плодовые субстраты предварительно разбавлялись водой для достижения оптимальной кислотности.

Данные, приведенные в таблице 12, представляют собой теоретический выход сусла из 1 тонны мезги, проходящей через пресс, с округлением до одной цифры после запятой. Такой характер представления результатов наиболее наглядно, с нашей точки зрения, позволяет выявить зависимость изменения долей самотечной и прессовых фракций в составе общей массы сусла, а также изменение общего выхода сусла при обработке ФП, так как образцы мезги, поступающей на прессование, различались по объему.

Таблица 12 - Влияние ФП на выход самотечных и прессовых фракций сусла из мезги по завершении стадии мацерации (стадии технологического процесса 4-5, таблицы 10, 11).

| Ферментный препарат, используемый в процессе настаивания сусла на мезге | Способ обработки мезги в процессе получения сусла | | |
|---|---|---|---|
| | Выход сока-самотека из 1 т мезги, дм ³ | Выход прессовых фракций из 1 т мезги, дм ³ | Общий выход сусла из 1 т мезги, дм ³ |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Рябина «Красавица» | | | |
| ВІ 7.7 | 358±8,2 | 414±8,3 | 770±11 |
| ВІ niaD(-) | 352±8,3 | 409,2±8,5 | 760±11 |
| Без ФП | 229±5,7 | 520±11 | 750±13 |
| Слива «Желтая Хопты» | | | |
| ВІ 7.4 | 710±10,6 | 147,7±2,9 | 858,6±14,6 |
| ВІ niaD(-) | 442±6,6 | 165±3,4 | 607±8,5 |
| Без ФП | 242,7±5,5 | 316,4±6,3 | 559±8,4 |
| Черная смородина | | | |
| ВІ 7.4 | 618,2±9,5 | 242,7±5,5 | 861±9,6 |
| ВІ niaD(-) | 604±9,3 | 237,3±5,8 | 840±10 |
| Без ФП | 545,5±8,2 | 275±6,3 | 821±8,5 |
| Виноград «Цимлянский Черный» | | | |
| ВІ 7.7 | 574,7±8,3 | 172±3,4 | 746,6±8,4 |
| ВІ niaD(-) | 533±7,9 | 178,1±3,7 | 711,1±9,9 |
| Без ФП | 340±6,8 | 233,3±5,1 | 573,3±8,5 |
| Виноград «Каберне Совиньон» | | | |
| ВІ 7.7 | 595,3±7,9 | 198,8±3,9 | 794,1±8,7 |
| ВІ niaD(-) | 582±6,9 | 193,4±3,8 | 780±10,8 |
| Без ФП | 429±6 | 297,5±6,1 | 726,5±8,7 |
| Виноград «Изабелла» | | | |
| ВІ 7.7 | 610±8,5 | 192±3,8 | 800±8,8 |
| ВІ niaD(-) | 531,4±7,4 | 227,6±4,5 | 759±9,1 |
| Без ФП | 457,5±6,8 | 292,5±5,2 | 750±9 |
| Виноград «Ркацители» | | | |

Продолжение таблицы 12.

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------|-----------|-----------|-----------|
| ВІ 7.7± | 572,7±8,6 | 181±3,6 | 754±9 |
| ВІ niaD(-)± | 532,6±7,5 | 207,2±4,3 | 739,8±8,1 |
| Без ФП ± | 453±6,8 | 278±5,5 | 731±8,7 |

Весьма четко удается проследить увеличение общего объема сусла, получаемого из мезги, после ее обработки лабораторными ФП. Очевидно также, что выбранные для использования по результатам проводимых ранее экспериментов ФП ВІ 7.7 и ВІ 7.4 превосходят по эффективности ФП ВІ niaD(-), полученный с помощью исходного реципиентного штамма, и, каждый для своего типа сырья (ВІ 7.7 – для рябины и винограда, ВІ 7.4 – для сливы и черной смородины), позволяют добиться достаточно стабильных показателей выхода сусла. Так, использование новых ФП в технологии фруктовых вин увеличивало общий выход сусла на 10-50 %, при этом выход сусла из ферментированной мезги для всех видов плодового сырья составляет 75-85 % от массы мезги, поступившей на прессование. Выход сусла из виноградной мезги с применением выбранного ранее препарата ВІ 7.7 также заметно возросло, что соответствует ранее полученным результатам (см. таблицу 8).

Анализируя данные, представленные в таблице 12, можно заключить, что при ферментативной обработке виноградной мезги увеличивается доля самотечной фракции в общем объеме сусла. Это особенно важно, если модернизация технологического процесса направлена на корректировку качества получаемого полупродукта. Самотечное сусло отличается от прессовых фракций меньшим содержанием взвесей и волокон, составляющих осадочную массу и препятствующих в дальнейшем фильтрации и осветлению сусла.

6.2 Физико-химические показатели самотечных и прессовых фракций сусла, полученных в процессе изготовления фруктовых и виноградных вин с помощью ферментных препаратов

Вязкость сусла, выходящего из-под пресса, и содержание в нем взвешенных веществ достаточно сильно влияет на длительность и эффективность его обработки перед брожением. Эти факторы обуславливают необходимость использования различных средств и методов осветления, а также влияют на время, затрачиваемое на отстаивание сусла. Результаты влияния на эти параметры обработки сусла фруктовых и виноградных вин лабораторными ФП представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Показатели вязкости сусла и содержания в нем взвесей по завершении мацерации с использованием ФП (стадии технологического процесса 4-5, таблицы 10, 11).

| Ферментный препарат, используемый в процессе настаивания сусла на мезге | Показатели самотечных фракций сусла | | Показатели прессовых фракций сусла | |
|---|-------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| | Вязкость сусла, сПз | Массовая концентрация взвесей в сусле, г/100 см ³ | Вязкость сусла, сПз | Массовая концентрация взвесей в сусле, г/100 см ³ |
| Рябина «Красавица» | | | | |
| ВІ 7.7 | 0,28±0,02 | 1,03±0,11 | 0,39±0,03 | 2,03±0,14 |
| ВІ niaD(-) | 0,31±0,02 | 1,1±0,1 | 0,43±0,04 | 2,08±0,18 |
| Без ФП | 0,33±0,02 | 1,18±0,12 | 0,46±0,04 | 2,18±0,15 |
| Слива «Желтая Хопты» | | | | |
| ВІ 7.4 | 0,74±0,04 | 1,93±0,12 | 1,0±0,1 | 2,93±0,17 |
| ВІ niaD(-) | 0,77±0,04 | 2,06±0,13 | 1,2±0,1 | 3,05±0,18 |
| Без ФП | 0,79±0,04 | 2,17±0,13 | 1,32±0,13 | 3,17±0,16 |
| Черная смородина | | | | |
| ВІ 7.4 | 0,31±0,03 | 1,47±0,12 | 0,41±0,03 | 2,47±0,19 |
| ВІ niaD(-) | 0,36±0,02 | 1,64±0,11 | 0,47±0,04 | 2,64±0,16 |
| Без ФП | 0,38±0,03 | 1,87±0,13 | 0,53±0,04 | 2,87±0,15 |
| Виноград «Цимлянский Черный» | | | | |
| ВІ 7.7 | 0,41±0,03 | 2,29±0,17 | 0,55±0,04 | 3,29±0,18 |
| ВІ niaD(-) | 0,42±0,03 | 2,37±0,16 | 0,57±0,04 | 3,37±0,18 |
| Без ФП | 0,42±0,03 | 3,3±0,2 | 0,57±0,04 | 4,3±0,2 |
| Виноград «Каберне Совиньон» | | | | |
| ВІ 7.7 | 0,51±0,04 | 1,71±0,12 | 0,61±0,04 | 2,71±0,14 |
| ВІ niaD(-) | 0,53±0,03 | 1,6±0,1 | 0,65±0,05 | 2,63±0,16 |
| Без ФП | 0,53±0,03 | 2,21±0,14 | 0,64±0,05 | 3,21±0,18 |
| Виноград «Изабелла» | | | | |
| ВІ 7.7 | 0,42±0,03 | 2,14±0,13 | 0,52±0,04 | 3,14±0,14 |
| ВІ niaD(-) | 0,40±0,03 | 2,43±0,14 | 0,54±0,04 | 3,43±0,13 |
| Без ФП | 0,44±0,03 | 2,85±0,13 | 0,56±0,04 | 3,85±0,12 |
| Виноград «Ркацители» | | | | |
| ВІ 7.7 | 0,42±0,03 | 1,68±0,11 | 0,56±0,05 | 2,68±0,12 |
| ВІ niaD(-) | 0,42±0,03 | 1,89±0,11 | 0,56±0,04 | 2,89±0,15 |
| Без ФП | 0,44±0,03 | 2,43±0,17 | 0,59±0,04 | 3,43±0,17 |

С применением лабораторных ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7 вязкость сусла самотечных и прессовых фракций сока плодового сырья и массовая доля взвесей в них снижались относительно ФП образцов сусла, полученного с помощью ФП ВІ niaD(-) и контрольных образцов сусла, не обработанного ФП. Значимость такого эффекта нельзя недооценивать. Сусло большей прозрачности с меньшей вязкостью проще поддается осветлению, а в условиях производства – более эффективно фильтруется.

В случае виноградного сусла различие в показателях опытных и контрольных образцов несколько сглажено, видимо, из-за особенности полисахаридного состава сырья (меньшего содержания пектиновых веществ). Тем не менее, тенденция положительного влияния

применения ФП на исследованные характеристики суслу красных и белого сортов винограда вполне очевидно.

6.3 Физико-химические показатели полученных с помощью ферментных препаратов фруктовых и виноградных вин

В таблицах 14-16 представлены результаты определения основных регламентируемых физико-химических параметров полученных с помощью применения ФП вин, а также параметров, помогающих составить представление о качестве виноматериалов. В случае некрепленых сладких фруктовых вин (таблица 14), заметно снижение содержания летучих кислот в образцах, изготовленных с применением ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7. Эту зависимость наблюдали и применительно к другим полученным в нашей работе виноматериалах (таблицы 15-16).

Таблица 14 - Физико-химические показатели натуральных сладких фруктовых вин.

| Показатель | Некрепленые сладкие фруктовые вина | | | | | | | | |
|---|------------------------------------|---------------|---------------|----------------------|---------------|---------------|------------------|---------------|---------------|
| | Рябина «Красавица» | | | Слива «Желтая Хопты» | | | Черная смородина | | |
| | ВІ 7.7 | ВІ niaD(-) | Без ф.п. | ВІ 7.4 | ВІ niaD(-) | Без ф.п. | ВІ 7.4 | ВІ niaD(-) | Без ф.п. |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Объемная доля этилового спирта, %об. | 13,4± 0,4 | 13,4± 0,5 | 13,4± 0,3 | 13,5± 0,3 | 13,5± 0,4 | 13,5± 0,5 | 14,4± 0,3 | 14,4± 0,3 | 14,4± 0,4 |
| Массовая концентрация приведенного экстракта, г/л | 14,2± 1,0 | 14,2± 0,8 | 14,2± 0,9 | 13,5± 0,8 | 13,5± 0,7 | 13,6± 0,7 | 14,4± 0,7 | 14,5± 0,9 | 14,5± 1,1 |
| Массовая концентрация сахаров, г/л | 118±5 | 118±4 | 118±5 | 100±3 | 100±3 | 101±3 | 100±3 | 101±4 | 102± 3 |
| Массовая концентрация титруемых кислот, г/л | 5,1± 0,2 | 5,1± 0,3 | 5,1± 0,3 | 6,6± 0,4 | 6,6± 0,3 | 6,7± 0,3 | 7,8± 0,3 | 7,8± 0,3 | 7,9± 0,4 |
| Массовая концентрация летучих кислот в пересчете на уксусную кислоту, г/л | 0,46± 0,01 | 0,45± 0,02 | 0,52± 0,02 | 0,38± 0,01 | 0,39± 0,01 | 0,43± 0,01 | 0,25± 0,01 | 0,26± 0,01 | 0,34± 0,01 |
| Интенсивность цвета | 0,69± 0,02 | 0,69± 0,02 | 0,62± 0,03 | 0,18± 0,01 | 0,18± 0,01 | 0,12± 0,01 | 6,28± 0,23 | 6,29± 0,22 | 6,12± 0,22 |

Продолжение таблицы 14.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| Отенок | 1,01± 0,05 | 1,01± 0,05 | 0,95± 0,05 | 2,1±0,1 | 2,1±0,1 | 2,1± 0,1 | 0,93± 0,09 | 0,94± 0,09 | 0,92± 0,09 |
| Относит. яркость, % | 64,6± 3,2 | 64,3± 3,2 | 65,7± 3,8 | 90,7± 6,4 | 90,5± 6,5 | 92,1± 7,6 | 7,6± 0,4 | 7,5± 0,4 | 8,6± 0,4 |
| Общее содержание фенолов, г/л | 0,97± 0,04 | 0,97± 0,04 | 0,99± 0,03 | 0,67± 0,03 | 0,68± 0,03 | 0,69± 0,03 | 1,55± 0,06 | 1,54± 0,06 | 1,52± 0,06 |
| Массовая концентрация красящих веществ (антоцианов), г/л | 0,61± 0,03 | 0,56± 0,02 | 0,64± 0,03 | 0,34± 0,02 | 0,37± 0,02 | 0,32± 0,02 | 0,93± 0,04 | 0,92± 0,04 | 0,91± 0,04 |
| Общее содержание SO ₂ , мг/л | 107± 10 | 108,1± 9,2 | 107,8± 9,5 | 113± 10 | 113,2± 10,6 | 112,6± 9,7 | 116±9 | 114,9± 10,4 | 117± 11,5 |
| Содержание свободного SO ₂ , мг/л | 64,2± 5,2 | 64,6± 5,9 | 64,8± 6,7 | 67,8± 5,3 | 67,2± 6,4 | 67,6± 5,9 | 69,6± 5,7 | 68,4± 6,1 | 70,2± 6,5 |

В дополнение к органолептической оценке цветовых характеристик, результаты которой будут представлены ниже, в таблицах 14-16 обращают на себя внимание результаты оценки показателей интенсивности окраски образцов вин, подтверждающие отсутствие снижения насыщенности и густоты цвета продукта с сокращением стадии мацерации в присутствии ФП. Кроме того, результаты определения в образцах вин общего содержания фенолов и антоцианов (спектрофотометрическим методом) указывают на отсутствие обедненности химического состава виноматериалов, прошедших сокращенный этап настаивания сусла на мезге.

Таблица 15 - Физико-химические показатели сухих фруктового и виноградных вин.

| Показатель | Сухие фруктовое и виноградные вина | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|---------------|--------------|---------------------|---------------|----------|----------------------|---------------|----------|
| | Рябина «Красавица» | | | Виноград «Изабелла» | | | Виноград «Ркацители» | | |
| | ВІ 7.7 | ВІ niaD(-) | Без ф.п. | ВІ 7.7 | ВІ niaD(-) | Без ф.п. | ВІ 7.7 | ВІ niaD(-) | Без ф.п. |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Объемная доля этилового спирта, %об. | 13±0,5 | 13± 0,5 | 13±0,5 | 11±0,5 | 11± 0,3 | 11±0,3 | 10±0,5 | 10± 0,5 | 10±0,5 |
| Массовая концентрация приведенного экстракта, г/л | 13,5± 0,8 | 13,5± 0,7 | 13,5± 0,9 | 18±0,8 | 18± 0,5 | 18±1,0 | 18±0,8 | 17± 0,9 | 17±0,7 |

Продолжение таблицы 15.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Массовая концентрация сахаров, г/л | - | - | - | 0,42± 0,02 | 0,37± 0,02 | 0,41± 0,02 | 0,44± 0,02 | 0,41± 0,02 | 0,40± 0,02 |
| Массовая концентрация титруемых кислот, г/л | 5,3±0,3 | 5,3±0,3 | 5,4±0,4 | 7,3±0,3 | 7,2±0,3 | 7,3±0,3 | 7,2±0,4 | 7,2±0,3 | 7,2±0,4 |
| Массовая концентрация летучих кислот в пересчете на уксусную кислоту, г/л | 0,51± 0,04 | 0,51± 0,02 | 0,55± 0,02 | 0,45± 0,01 | 0,44± 0,01 | 0,53± 0,02 | 0,31± 0,01 | 0,32± 0,01 | 0,42± 0,01 |
| Интенсивность цвета | 2,1±0,1 | 1,9±0,1 | 2,1±0,1 | 1,14± 0,04 | 1,07± 0,06 | 1,11± 0,04 | 0,22± 0,01 | 0,18± 0,02 | 0,11± 0,005 |
| Оттенок | 0,80± 0,04 | 0,80± 0,04 | 0,72± 0,04 | 0,81± 0,04 | 0,81± 0,04 | 0,72± 0,04 | 2,3± 0,1 | 2,1± 0,1 | 2,1± 0,1 |
| Относительная яркость, % | 36±1,8 | 31±1,8 | 38±1,8 | 46±2,3 | 47±2,3 | 48±2,3 | 91±4,6 | 91± 4,5 | 92±4,5 |
| Общее содержание фенолов, г/л | 0,91± 0,03 | 0,88± 0,04 | 0,91± 0,03 | 1,16± 0,04 | 1,23± 0,04 | 1,33± 0,05 | 0,73± 0,03 | 0,73± 0,02 | 0,71± 0,03 |
| Массовая концентрация красящих веществ (антоцианов), г/л | 0,51± 0,02 | 0,48± 0,02 | 0,51± 0,02 | 0,65± 0,03 | 0,67± 0,02 | 0,76± 0,03 | 0,42± 0,02 | 0,39± 0,02 | 0,42± 0,02 |
| Общее содержание SO ₂ , мг/л | 117± 8,9 | 117± 9,1 | 118± 8,8 | 180±11 | 183±10 | 180±10 | 181± 9,9 | 180±10 | 181± 9,5 |
| Содержание свободного SO ₂ , мг/л | 70±7 | 70±6 | 70±7 | 116±9 | 116±8 | 116±8 | 115± 7,5 | 115±8 | 115± 7,7 |

Содержание общего и свободного диоксида серы в винах полностью соответствовало используемым дозировкам K₂S₂O₇. При таком виде сульфитирования вносить K₂S₂O₇ следует в двукратной дозировке от количества необходимого содержания диоксида серы в дальнейшем [168].

Таблица 16 - Физико-химические показатели полусухого красного вина (сорт винограда «Цимлянский Черный») и полусладкого розового вина (сорт винограда «Каберне Совиньон»).

| Показатель | Полусухое и полусладкое столовые виноградные вина | | | | | |
|---|---|------------|------------|-----------------------------|------------|------------|
| | Виноград «Цимлянский черный» | | | Виноград «Каберне Совиньон» | | |
| | ВІ 7.7 | ВІ niaD(-) | Без ф.п. | ВІ 7.7 | ВІ niaD(-) | Без ф.п. |
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6</i> | <i>7</i> |
| Объемная доля этилового спирта, %об. | 10,1±0,3 | 10,2±0,5 | 10,1±0,3 | 10,3±0,3 | 10,2±0,4 | 10,3±0,4 |
| Массовая концентрация приведенного экстракта, г/л | 22,5±1,1 | 22,3±1,3 | 23,1±1,1 | 18±1,1 | 19,2±0,9 | 20,4±1,1 |
| Массовая концентрация сахаров, г/л | 15,8±0,5 | 15,5±0,6 | 15,3±0,6 | 30,4±2,1 | 30,3±2,4 | 30,4±2,2 |
| Массовая концентрация титруемых кислот, г/л | 7,1±0,4 | 7,1±0,4 | 7,1±0,4 | 6,4±0,4 | 6,4±0,3 | 6,4±0,3 |
| Массовая концентрация летучих кислот в пересчете на уксусную кислоту, г/л | 0,45± 0,02 | 0,43±0,01 | 0,58± 0,02 | 0,41±0,02 | 0,42± 0,01 | 0,64±0,03 |
| Интенсивность цвета | 6,3±0,2 | 7,04±0,25 | 6,8±0,2 | 5,6±0,2 | 5,8±0,2 | 5,77±0,23 |
| Оттенок | 0,88±0,05 | 0,99±0,05 | 1,01±0,05 | 1,15±0,05 | 0,83±0,04 | 0,65±0,03 |
| Относительная яркость, % | 5,14±0,25 | 2,02±0,11 | 2,93±0,13 | 62,3±3,6 | 55,3±2,7 | 54,4±2,8 |
| Общее содержание фенолов, г/л | 2,38±0,09 | 2,36±0,09 | 2,39±0,09 | 0,82±0,03 | 0,91±0,03 | 1,14±0,04 |
| Массовая концентрация красящих веществ (антоцианов), г/л | 1,35± 0,05 | 1,36±0,05 | 1,38±0,05 | 0,52±0,02 | 0,71± 0,03 | 0,83± 0,04 |
| Общее содержание SO ₂ , мг/л | 173±11 | 174±10 | 173±11 | 182±12 | 182±10 | 182±11 |

Продолжение таблицы 16.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|------|----------|------|------|----------|-------|
| Содержание свободного SO ₂ , мг/л | 95±8 | 95,5±7,5 | 95±6 | 99±6 | 98,8±7,5 | 100±7 |

Таким образом, по результатам, полученным в ходе изготовления виноматериалов, и после физико-химической оценки образцов вин можно сделать вывод о целесообразности применения исследуемых лабораторных ФП в винодельческой промышленности. Их использование способствует увеличению выхода суслу из плодовой и виноградной мезги, интенсификации процессов осветления и фильтрации за счет понижения вязкости суслу и содержания в нем взвесей, а также получению виноматериалов, обогащенных красящими веществами, и с меньшим содержанием летучих компонентов, отвечающих за ноты окисленности в аромате готовых вин [165].

6.4 Органолептическая оценка полученных фруктовых и виноградных вин

В пищевой промышленности важное значение имеет органолептический анализ продукта, определяющий его ценность и востребованность на рынке, поэтому нами была проведена органолептическая оценка полученных с помощью применения ФП фруктовых и виноградных вин.

В таблице А1 приложения А представлены результаты проведенной органолептической оценки фруктовых сладких вин из рябины, сливы и черной смородины, прошедших обработку ФП ВІ 7.7 и ВІ 7.4, показавшими наибольшую эффективность по результатам предшествующих экспериментов, и контрольных образцов вин, для получения которых не применяли ФП. Полученные данные иллюстрируют видимое повышение прозрачности вин при применении ФП (t-критерий этих показателей выше порога значимости). Кроме того, вино из желтой сливы, обработанное ФП ВІ 7.4, отличалось большей сбалансированностью и привлекательностью цвета по мнению участников органолептических испытаний.

На рисунке 28 изображены чувствительные различия в составляющих аромата и внешних характеристиках исследуемых образцов сладких фруктовых вин, прошедших обработку выбранными ФП, с контрольными образцами.

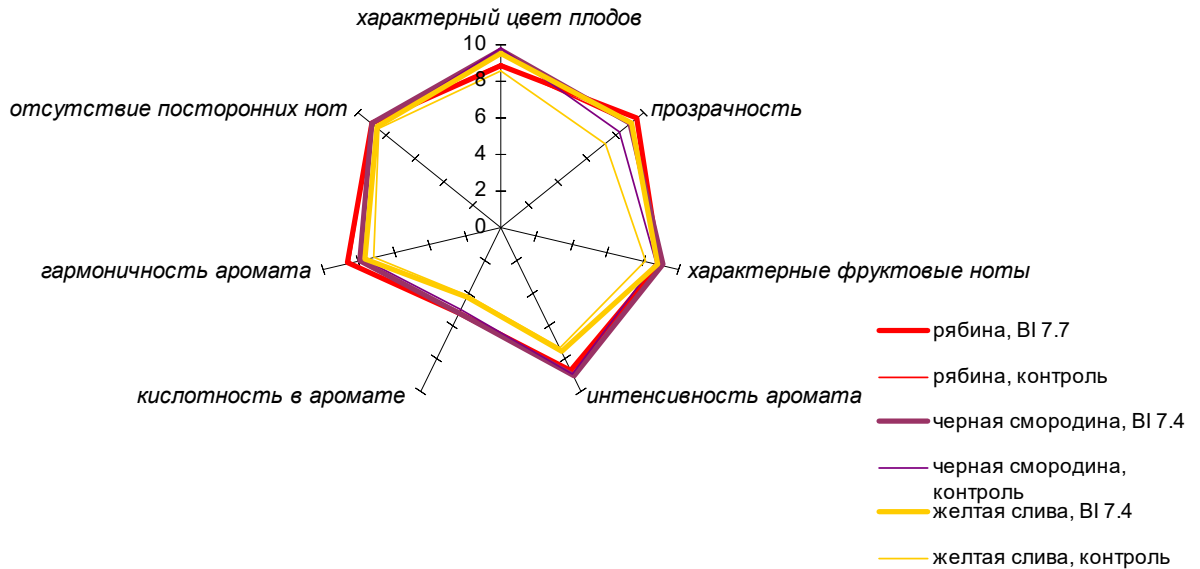


Рисунок 28 - Органолептическая диаграмма внешнего вида и ароматических характеристик образцов сладких натуральных фруктовых вин.

Очевидно, что вина, полученные в результате применения ФП, отличаются меньшим количеством взвесей и меньшей мутностью, что в дальнейшем облегчит процессы осветления и фильтрации. Этот эффект особенно ярко выражен на примере вина из желтой сливы. На рисунке 29 наглядно показана разница вкусовых характеристик полученных образцов вин. Органолептическая диаграмма, иллюстрирующая вкусовые параметры вин, позволяет заключить, что использование ФП в технологии производства не оказывает существенного влияния на гармоничность вкуса продукта.

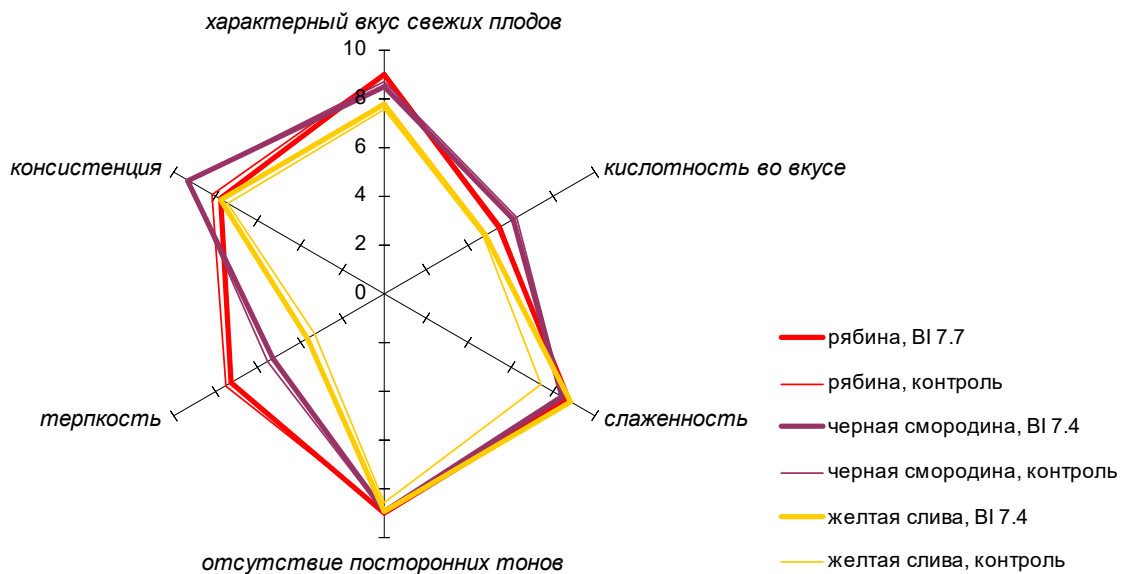


Рисунок 29 - Органолептическая диаграмма вкусовых качеств образцов сладких натуральных фруктовых вин.

Органолептическая оценка сухого вина из рябины, сухих виноградных вин из сортов «Изабелла» и «Ркацители», полусухого красного вина из винограда сорта «Цимлянский черный» и полусладкого вина из винограда сорта «Каберне Совиньон», подразумевающая определение таких параметров, как фруктовые и сортовые тона в аромате, а также основные параметры вкуса, представлена в таблицах А2 и А3 приложения А. Использование ФП в технологии получения виноградных вин положительно сказывалось на внешних характеристиках продукта (ярко выражено на примере сорта «Изабелла», «Ркацители», «Каберне Совиньон») и не оказывало заметного влияния на другие органолептические показатели.

На рисунках 30-33 приведены результаты органолептических тестов полученных виноградных вин и сухого вина из рябины. Очевидно, что вино из сорта «Ркацители», полученное с помощью ФП VI 7.7, отличалось значительно большей прозрачностью.

Значимой зависимости средних значений атрибутов вкуса от применения в технологии ферментативной обработки суслу не наблюдалось (рисунки 31, 33).

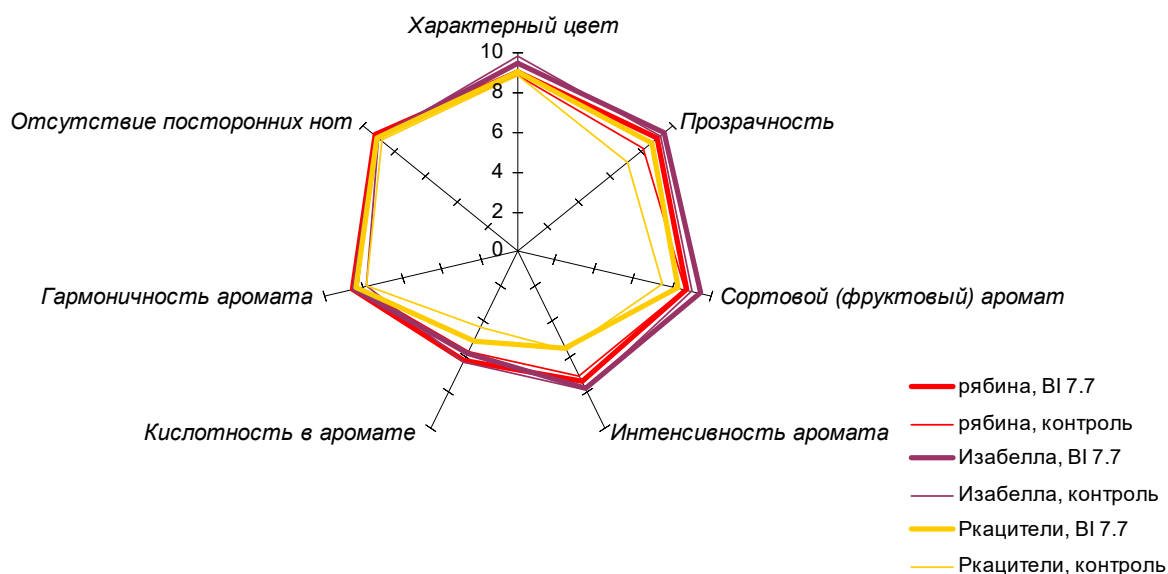


Рисунок 30 - Органолептическая диаграмма внешнего вида и ароматических характеристик образцов сухих фруктового и виноградных вин.

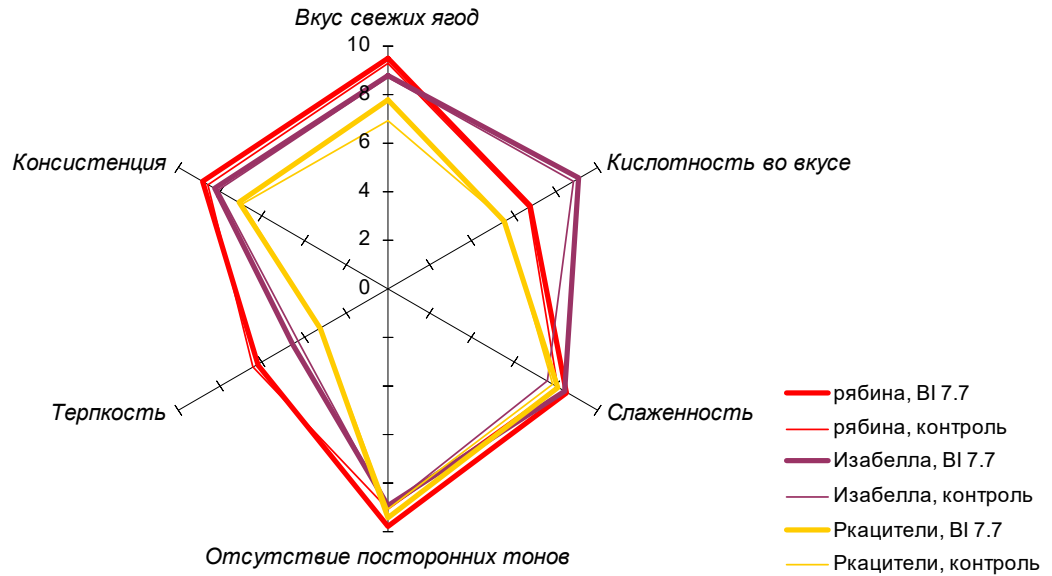


Рисунок 31 - Органолептическая диаграмма вкусовых качеств образцов сухих фруктового и виноградных вин.

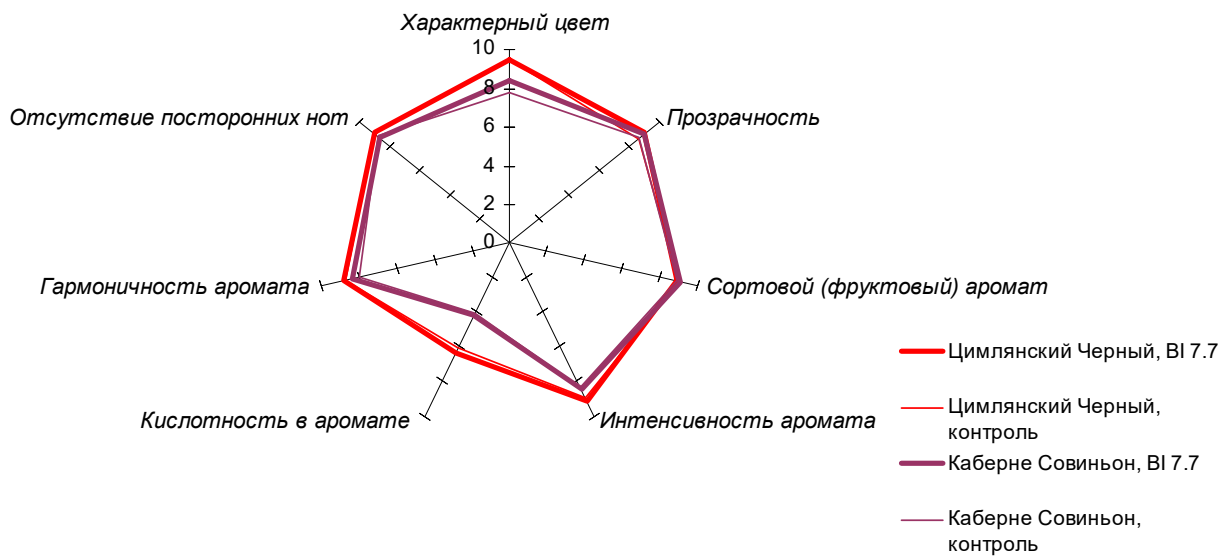


Рисунок 32 - Органолептическая диаграмма внешнего вида и ароматических характеристик образцов полусухого и полусладкого виноградных вин.

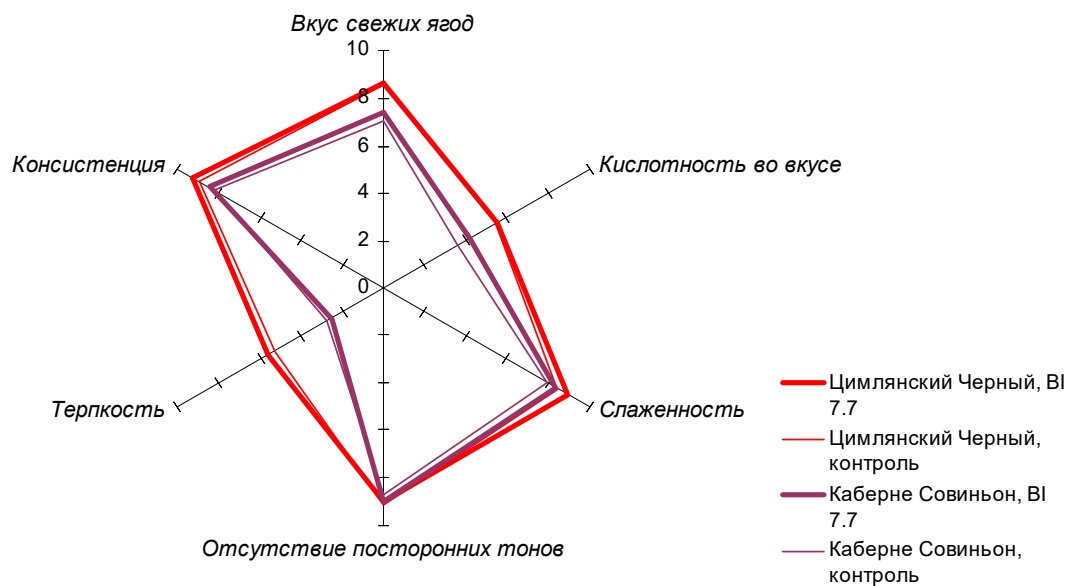


Рисунок 33 - Органолептическая диаграмма вкусовых качеств образцов полусухого и полусладкого виноградных вин.

Таким образом, по результатам проведения органолептических тестов можно заключить, что применение используемых нами ФП, в технологиях виноградного виноделия и в производстве фруктовых вин, позволяет получить гармоничные вина с яркими фруктовыми нотами в аромате.

ГЛАВА 7 СОСТАВ ЭКСТРАКТОВ СБРОЖЕННЫХ ВИНОГРАДНЫХ ВЫЖИМОК, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ферментативную обработку виноградных выжимок проводили для определения потенциальных возможностей использования новых ФП при получении функциональных продуктов из отходов традиционного винодельческого производства. Сброженные выжимки из красных сортов винограда поступали замороженными, перед началом работы определяли процентное содержание сухих веществ в выжимках путем их высушивания для достижения точности выбора дозировок ФП. В экстрактах виноградных выжимок определяли содержание в водной фракции глюкозы и ВС, а также наличие ряда фенольных соединений методом ВЭЖХ. Таким образом, сравнивали перспективность использования в этом направлении лабораторных ФП и коммерческих препаратов серии «Тренолин».

В ходе анализа данных проведенного гидролиза было определено, что временной интервал обработки выжимок ФП 24 часа позволил достигнуть заметных результатов в получении из сброженных выжимок сахаров и фенольных соединений (во временном промежутке от 3-х до 24-х часов наблюдалось увеличение концентрации ВС и глюкозы в экстрактах в среднем на 30 %; от 24-х часов до 48-ми – на 1-2 %). В то же время, среди используемых дозировок ФП наиболее удачной оказалась 5 мг/г с.в. субстрата (при увеличении дозировки от 2 до 5 мг/г с.в. субстрата содержание сахаров в экстрактах повышалось на 25-30 %, увеличение дозировки с 5 до 10 мг/г с.в. субстрата не приводило к видимым изменениям в содержании в экстрактах общих сахаров).

7.1 Накопление сахаров и глюкозы в гидролизатах сброженных виноградных выжимок в процессе ферментативной обработки

На рисунках 34-37 приведены данные для четырех сортов красных виноградных выжимок, характеризующие результаты гидролиза, проводимые в оптимальных условиях (24 часа, дозировка ФП - 5 мг/г, 50 °С), с точки зрения накопления в гидролизатах ВС и глюкозы.

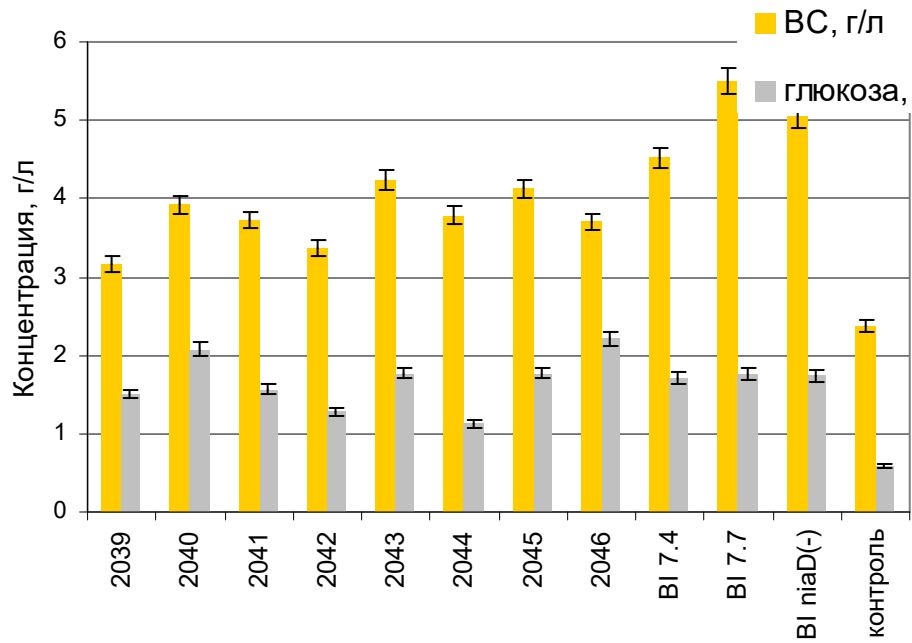


Рисунок 34 - Содержание ВС и глюкозы в гидролизатах виноградных выжимок сорта «Цвейильт» через 24 часа ферментативной обработки при 50 °С и дозировке ФП 5 мг/г с.в. субстрата.

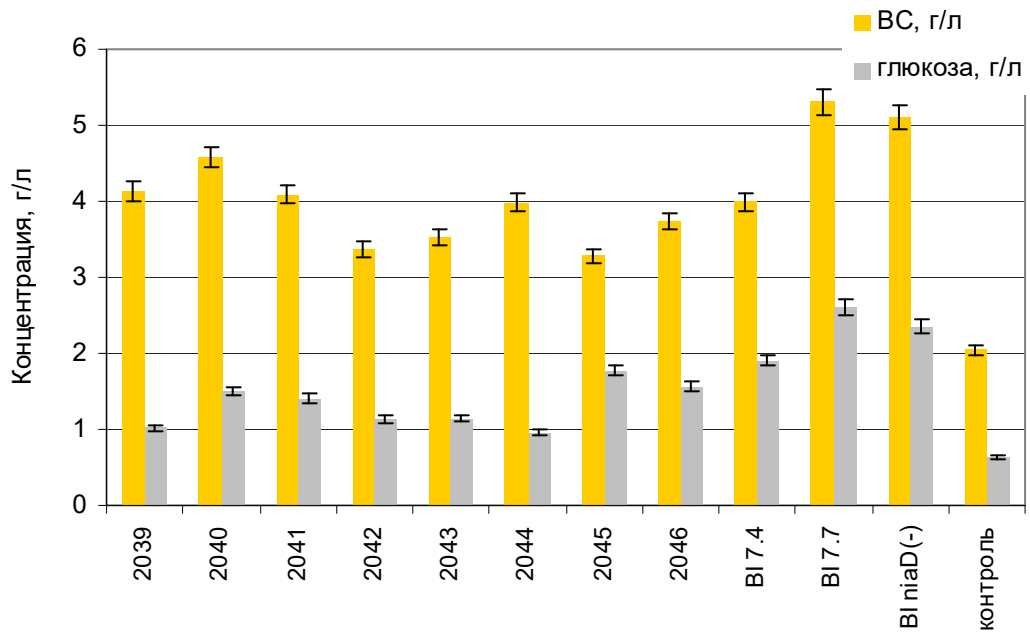


Рисунок 35 - Содержание ВС и глюкозы в гидролизатах виноградных выжимок сорта «Жупский» через 24 часа ферментативной обработки при 50 °С и дозировке ФП 5 мг/г с.в. субстрата.

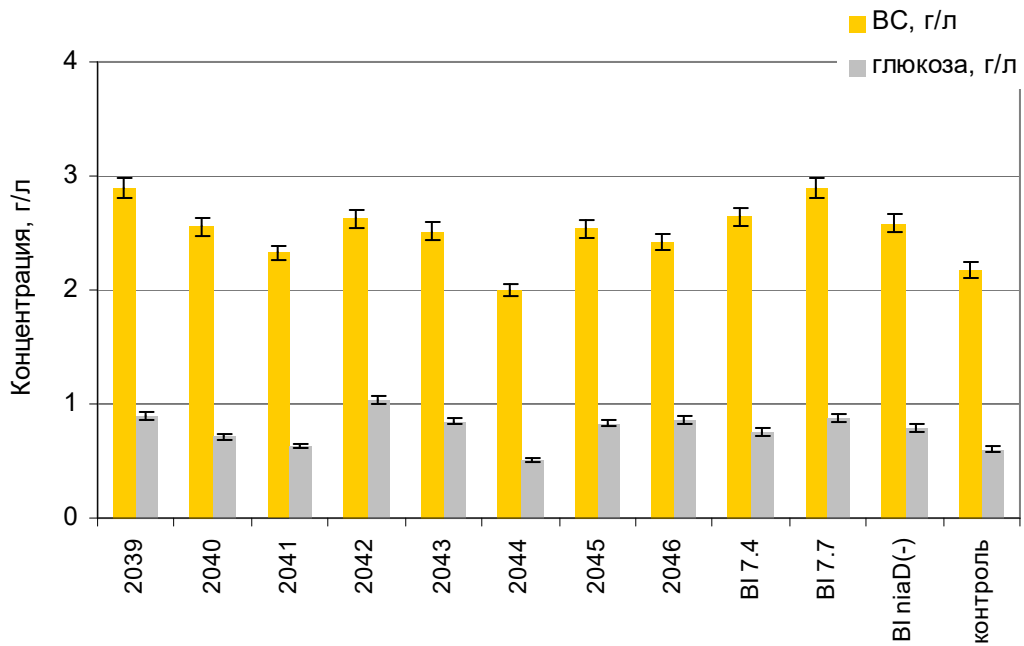


Рисунок 36 - Содержание ВС и глюкозы в гидролизатах виноградных выжимок сорта «Амур» через 24 часа ферментативной обработки при 50 °С и дозировке ФП 5 мг/г с.в. субстрата.

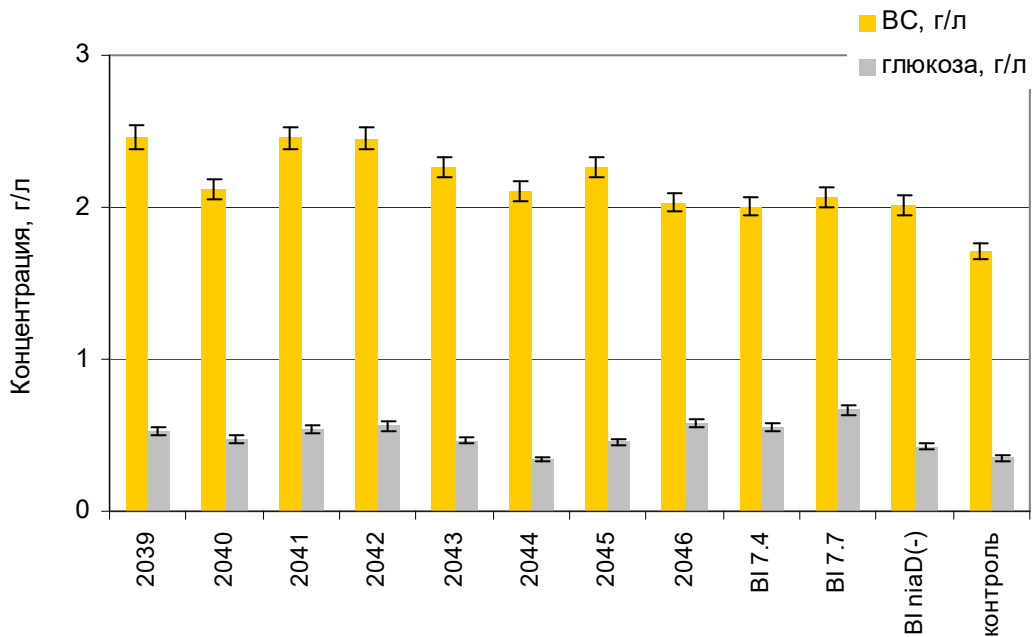


Рисунок 37 - Содержание ВС и глюкозы в гидролизатах виноградных выжимок сорта «Мерло» через 24 часа ферментативной обработки при 50 °С и дозировке ФП 5 мг/г с.в. субстрата.

Анализ этих данных подтверждает, что наиболее эффективным для переработки виноградных выжимок, с точки зрения выхода ВС и глюкозы, является препарат BI 7.7. Среди коммерческих ФП «Тренолин» наиболее эффективными можно считать препараты «Опти ДФ» (2043) и «Колор ДФ» (2045), которые превосходят показатели лабораторных ФП по

накоплению в субстрате сахаров для выжимок винограда сорта «Мерло». В остальных случаях лабораторный препарат ВІ 7.7 не уступает или превосходит показатели коммерческих аналогов, используемых в работе.

7.2. Накопление веществ фенольной природы в гидролизатах сброженных виноградных выжимок

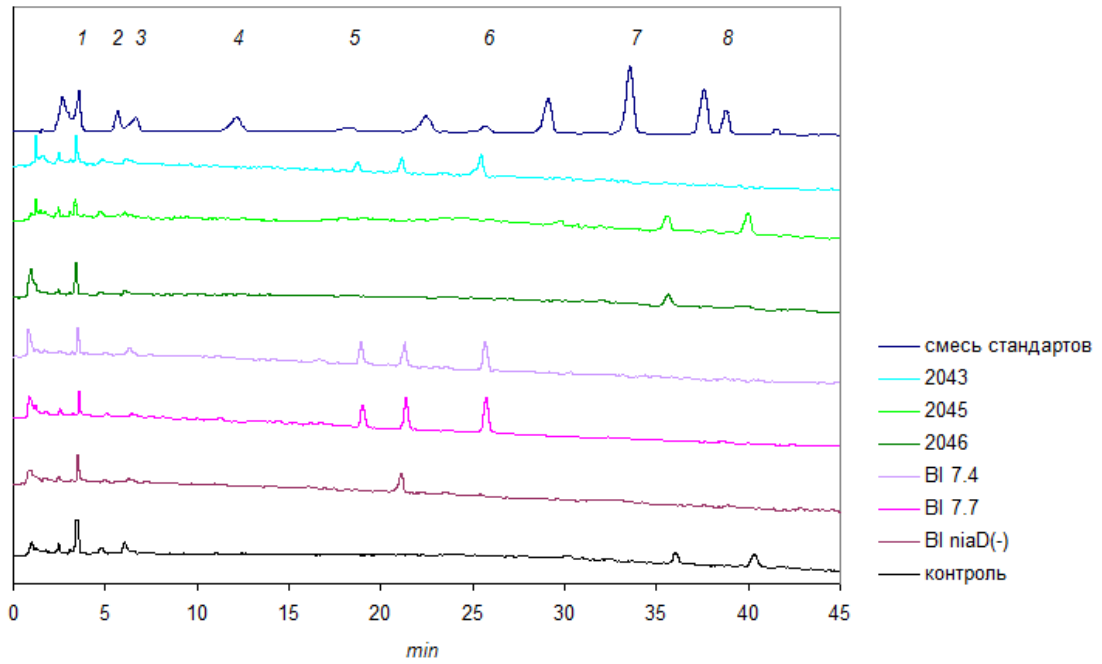
Эффективность действия ФП оценивали также с точки зрения накопления в гидролизатах полифенольных веществ относительно контрольной пробы. Содержание полифенольных веществ определяли методом ВЭЖХ.

Наибольший выход фенольных веществ в случае использования коммерческих ФП «Тренолин» наблюдали в образцах, обработанных ФП «Опти ДФ» (2043), «Колор ДФ» (2045) и «Руж ДФ» (2046). Образцы, полученные с использованием этих коммерческих ФП, представлены в результатах работы в качестве контроля на рисунках 38-41 (в таблице 17 представлены вещества фенольной природы, используемые в качестве стандартов при хроматографическом анализе состава гидролизатов виноградных выжимок).

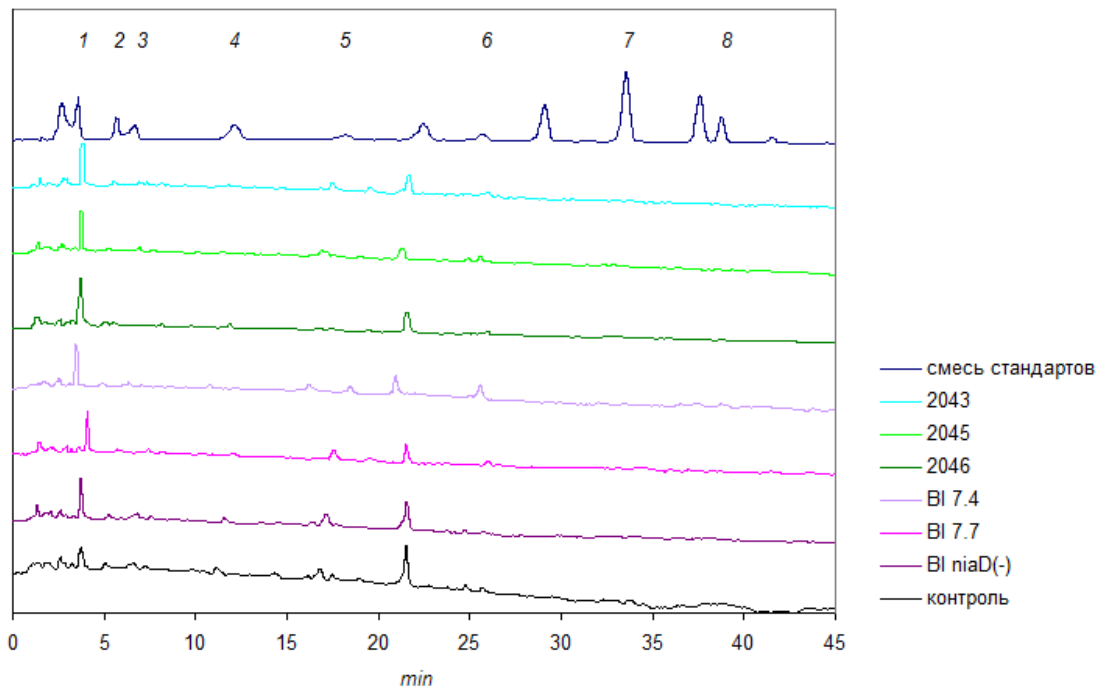
Таблица 17 - Вещества фенольной природы, включенные в смесь стандартов.

| Номера пиков на хроматограммах | Вещество |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | галловая кислота |
| 2 | пирокатехин |
| 3 | 3,4-дигидроксибензойная кислота |
| 4 | 4-гидроксибензойная кислота |
| 5 | 2-гидроксифенилуксусная кислота |
| 6 | ванилиновая кислота |
| 7 | кофеиновая кислота |
| 8 | сиреневая кислота |

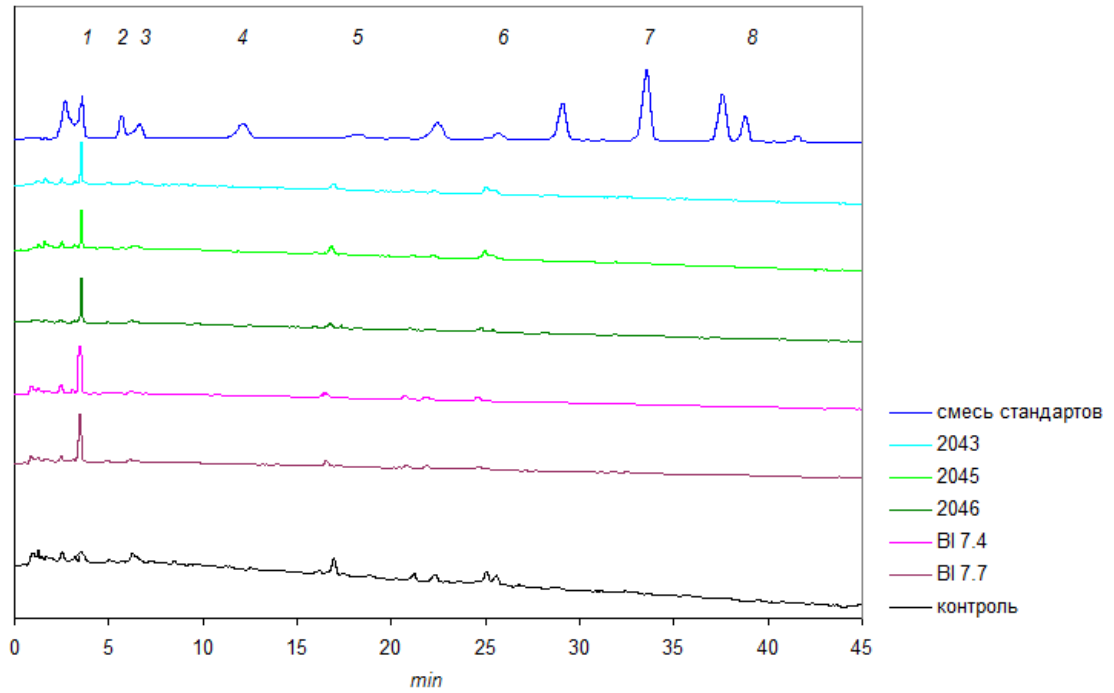
После обработки сброженных виноградных выжимок ФП наблюдали повышение содержания галловой кислоты в сравнении с контрольным образцом экстракта (без фермента). В случае обработки выжимок винограда сортов «Цвейильт», «Жупский» и «Амур» под воздействием лабораторных ФП экстракты обогащались 2-гидроксифенилуксусной и ванилиновой кислотами.



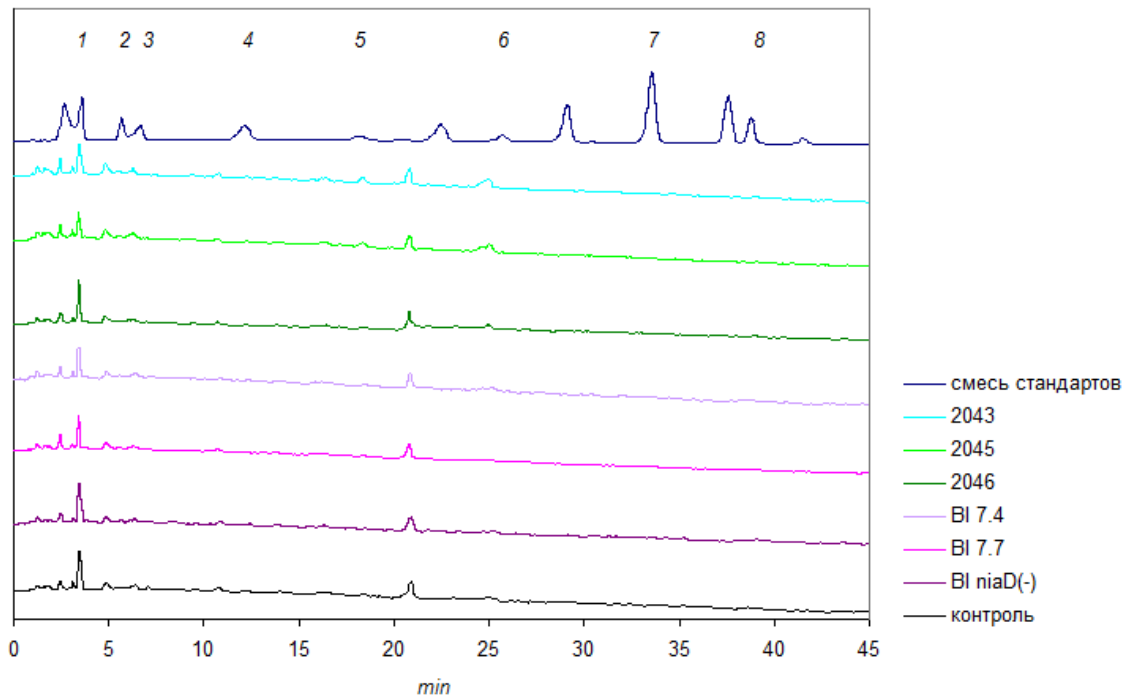
Номера пиков соответствуют номерам стандартов, приведенным в таблице 17.
 Рисунок 38 - Анализ содержания веществ фенольной природы после обработки ФП выжимок винограда сорта «Цвейилт» через 24 часа ферментативной обработки (50 °С, дозировка ФП 5 мг/г с.в. субстрата).



Номера пиков соответствуют номерам стандартов, приведенным в таблице 17.
 Рисунок 39 - Анализ содержания веществ фенольной природы после обработки ФП выжимок винограда сорта «Жупский» веществ фенольной природы через 24 часа ферментативной обработки (50 °С, дозировка ФП 5 мг/г с.в. субстрата).



Номера пиков соответствуют номерам стандартов, приведенным в таблице 17.
 Рисунок 40 - Анализ содержания веществ фенольной природы после обработки ФП выжимок винограда сорта «Амур» веществ фенольной природы через 24 часа ферментативной обработки (50 °С, дозировка ФП 5 мг/г с.в. субстрата).



Номера пиков соответствуют номерам стандартов, приведенным в таблице 17.
 Рисунок 41 - Анализ содержания веществ фенольной природы после обработки ФП выжимок винограда сорта «Мерло» веществ фенольной природы через 24 часа ферментативной обработки (50 °С, дозировка ФП 5 мг/г с.в. субстрата).

В выжимках из винограда «Мерло» после обработки ФП наблюдали наличие (кроме галловой кислоты) пирокатехина и 3,4-дигидроксибензойной кислоты.

Полученные данные позволяют заключить, что обработка виноградных выжимок лабораторными ФП дает возможность получить экстракты, обогащенные сахарами и галловой кислотой, являющейся антиоксидантом и используемой при синтезе ряда красителей и в качестве компонента косметических продуктов [125, 169], и другими веществами.

**ГЛАВА 8 ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ
ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ВІ 7.7**

Для исследования токсичности и аллергизирующих свойств выбрали лабораторный ФП, проявляющий высокую эффективность для широкого спектра растительного сырья - таким препаратом стал ФП ВІ 7.7, эффективный как при обработке плодового сырья, так и при обработке винограда и отходов винодельческого производства. В этом ФП и продуктах, полученных с его использованием, определяли общее содержание афлатоксинов и охратоксина А. Кроме того, был определен уровень токсичности ФП ВІ 7.7 и выявлены его аллергизирующие свойства. Для исследований использовали животные модели крыс Wistar и Norway Brown.

Эти показатели позволяют оценить безопасность использования данного ФП в пищевом производстве, в частности, при получении виноматериалов различного типа.

8.1 Содержание микотоксинов в ферментном препарате *Penicillium verruculosum* ВІ 7.7

В сухом лабораторном ФП ВІ 7.7, представляющем собой лиофилизат высушенной КЖ микроскопического гриба *P. verruculosum*, обнаружены афлатоксины, а также некоторое количество охратоксина А (таблица 18). В винах, получаемых по предложенным в нашей работе технологическим схемам, включающим стадию ферментативной обработки, предположительно невозможно будет достоверно зафиксировать присутствие в них охратоксина А в виду его низкого содержания. В образце коммерческого ФП серии «Тренолин», использованного в качестве контроля, также обнаружено наличие определяемых микотоксинов.

Таблица 18 - Содержание микотоксинов (афлатоксинов и охратоксина А) в ферментном препарате ВІ 7.7.

| Ферментный препарат | Содержание микотоксинов: | В 1 г белка ф.п., нг | Предполагаемое (расчетное) содержание в 1 л вина при дозировке ф.п. 0,05% от массы сырья, нг | Предельное содержание в ферментных препаратах в соответствии с Техническим Регламентом Таможенного Союза ТР ТС 029/2012 |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------|--|---|
| ВІ 7.7 | афлатоксинов | 76±2,4 | 50 | не допускается |
| | охратоксина А | 21,2±0,7 | 14* | |
| Dohler, Тренолин Колор (2045) | афлатоксинов | 2,8±0,3 | 1,4* | |
| | охратоксина А | 29,5± 0,9 | 14,7* | |

* не более чем (значение ниже предела обнаружения).

Для получения свободного от указанных токсинов лабораторного ФП ВІ 7.7 проводили ультрафильтрацию его растворов с помощью концентрирующих патронов Vivaspin 500 (мембрана PES 5,000) в центрифуге (15000 об/мин, 4 °С, 15 мин). При проведении ИФА-анализа полученных таким способом образцов микотоксинов зафиксировано не было.

8.2 Содержание микотоксинов в винах, полученных с использованием ферментного препарата *Penicillium verruculosum* ВІ 7.7

При определении содержания микотоксинов в образцах вин, изготовленных с использованием ФП ВІ 7.7, на первом этапе проводили тест «введено-найдено», искусственно внося стандарты микотоксинов в известной концентрации в вина, полученные без применения ФП по классической технологии. В таблице 19 приведены поправочные коэффициенты потери конечного значения содержания охратоксина А и афлатоксинов при определении их содержания в пробах виноградного вина «Цимлянский Черный», как наиболее интенсивно окрашенного. При последующих расчетах использовали эти коэффициенты потери, приняв их за максимально возможные.

Таблица 19 - Результаты теста «введено-найдено» для расчета поправочных коэффициентов потери при определении содержания микотоксинов в красном виноматериале методом ИФА-анализа, сорт винограда «Цимлянский Черный».

| Образец вина | Содержание афлатоксинов, нг/л | Поправочный коэффициент потери |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| Полусладкое красное столовое вино, «Цимлянский Черный». Концентрация введенных афлатоксинов – 50 нг/л | 38,9±2,3* | 1,2 |
| Полусладкое красное столовое вино, «Цимлянский Черный». Концентрация введенных афлатоксинов – 100 нг/л | 90,9±4,4 | |
| Образец вина | Содержание охратоксина А, нг/л | Поправочный коэффициент потери |
| Полусладкое красное столовое вино, «Цимлянский Черный». Концентрация введенного охратоксина А – 50 нг/л | 45,1±2,2* | 1,1 |

*не более чем (значение ниже предела обнаружения).

Кроме поправочных коэффициентов, полученных в результате теста «введено-найдено», учитывали фон (пробу контрольного образца, изготовленного без применения ФП). Полученные результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Результаты ИФА-анализа проб красного и розового столового вина, полученных с использованием ФП.

| Образец вина, полученного по технологической схеме с применением ФП VI 7.7 | Содержание афлатоксинов, нг/л | Содержание охратоксина А, нг/л |
|--|-------------------------------|--------------------------------|
| Полусухое красное столовое вино, «Цимлянский Черный» | 67,4±2,8 | 12±1,5* |
| Полусладкое розовое столовое вино, «Каберне Совиньон» | 36,4±1,4* | 13±1,8* |
| Сухое розовое столовое вино, «Изабелла» | 51,3±2,0 | ниже предела детектирования |
| Сухое белое столовое вино, «Ркацители» | 58,6±2,3 | ниже предела детектирования |
| Сухое фруктовое вино, рябина сортовая | 38,7±1,4* | 15±1,2* |
| Сладкое фруктовое вино, рябина сортовая | 43,3±1,6* | ниже предела детектирования |

*не более чем (значение ниже предела обнаружения).

Содержание охратоксина А в пробах вина не различимо, в то время как афлатоксины содержатся в образцах красных вин в следовых количествах (близки к пределу обнаружения либо немного ниже предела обнаружения, но эти результаты характеризуются высокой воспроизводимостью), что соответствует расчетным данным из вносимого количества ФП в сусло.

8.3 Показатели острой токсичности ферментного препарата *Penicillium verruculosum* VI 7.7

В таблице 21 приведены результаты, позволяющие оценить процент гибели крыс после однократного введения ФП в двух дозировках. Даже после введения значительной дозы препарата (5000 мг/кг веса) не удалось достичь результатов, позволяющих вычислить ЛД₅₀ (концентрацию вещества, вызывающую гибель 50 % животных при однократном введении в желудок). Очевидно, что полулетальная доза ФП VI 7.7 превышает 5 г/кг веса животного, следовательно, согласно [155] данный препарат, как потенциально вредное вещество, можно условно отнести к IV классу опасности (вещества малоопасные) по степени воздействия на организм.

Таблица 21 - Результаты определения числа выживших животных в статистических группах.

| Группа животных | Доза ФП VI 7.7, мг/кг | Число погибших животных/число животных в группе |
|-----------------|--------------------------|---|
| 1 | 135 | 0/5 |
| 2 | 5000 | 0/5 |
| 3 | контроль | 0/5 |

В таблице 22 представлено изменение средней массы крыс по группам в течение эксперимента в динамике. Опираясь на представленные данные, можно судить о тенденции к увеличению прироста массы животных во времени с применением ФП, так как средняя масса тела животных группы № 2 (наибольшая доза введения ФП) возрастала наиболее интенсивно.

Таблица 22 - Динамика изменения средней массы тела переживших интоксикацию крыс (г) после однократного введения препарата.

| Время наблюдения | Исследуемые группы | | |
|---------------------|--------------------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Масса тела, г | | | |
| 0-ой день | 348±27 | 349±27 | 357±32 |
| 2-й день | 353±31 | 359±28 | 362±31 |
| 7-й день | 354±29 | 367±27 | 369±35 |
| 14-й день | 361±29 | 375±30 | 361±31 |

Чтобы объективно оценить приведенные в таблице 21 результаты, следует обратиться к рисунку 42, на котором наглядно представлена значимость полученных данных. Значения средней массы животных с учетом доверительного интервала перекрывают друг друга полностью или более чем на половину, что говорит об отсутствии статистической значимости результатов. Таким образом, прирост массы животных от употребления ими ферментного препарата VI 7.7 не наблюдали. О безопасности использования ФП VI 7.7 в данном случае говорит то, что не было выявлено снижения средней массы тела животных, подвергавшихся воздействию исследуемого ФП.

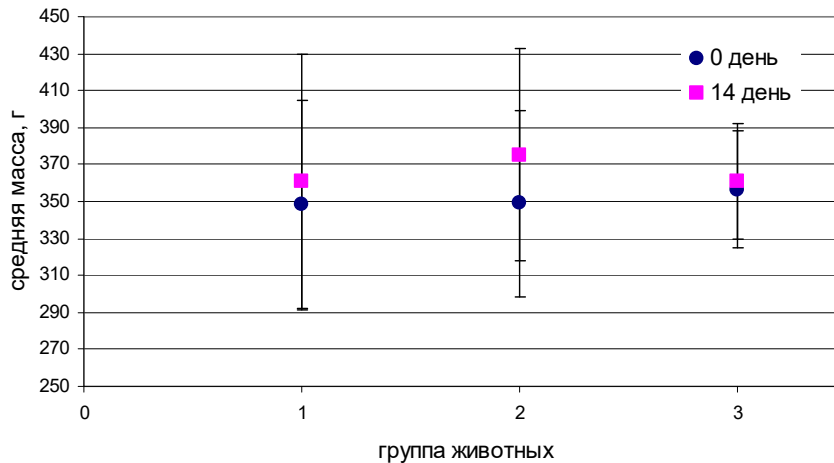


Рисунок 42 - Изменение средней массы крыс опытных и контрольной групп (г) за 14 дней после введения ФП. На рисунке указана средняя масса животных в группах в 0 и 14 день эксперимента, а также доверительные границы значений.

Данные вскрытия (некропсии)

Животные всех экспериментальных групп были подвергнуты эвтаназии передозировкой CO₂ в конце исследования (через 14 дней).

При макроскопическом исследовании видовых отличий, а также влияния пути введения на состояние и внешний вид внутренних органов установлено не было. В таблице 23 приведены данные, характеризующие возможные функциональные изменения внутренних органов животных вследствие получения большой дозы препарата.

Таблица 23 - Массовые коэффициенты (МК) органов крыс (г/кг веса тела) через 14 дней после введения препарата.

| Орган | Исследуемые группы | | |
|------------------|--------------------|-----------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Сердце | 3,4±0,3 | 3,4±0,2 | 3,3±0,2 |
| Легкие с трахеей | 7,0±0,5 | 7,2±0,4 | 7,6±0,3 |
| Тимус | 1,4±0,1 | 1,14±0,07 | 1,56±0,09 |
| Печень | 35,9±2,1 | 35,2±2,3 | 36,5±2,1 |
| Селезенка | 2,4±0,1 | 2,2±0,1 | 2,3±0,1 |
| Почки | 5,6±0,3 | 5,8±0,4 | 5,4±0,3 |
| Надпочечники | 0,21±0,02 | 0,23±0,01 | 0,23±0,02 |
| Головной мозг | 5,8±0,4 | 5,6±0,3 | 5,8±0,4 |
| Семенники | 3,8±0,2 | 3,6±0,4 | 3,7±0,3 |

Значимость приведенных пар значений (опытная группа - контрольная группа) для удобства оценивалась с помощью t-теста. Во всех случаях t-критерий не превысил порог значимости $t(P, f)$, что говорит об отсутствии влияния применения препарата на изменение размера органов опытных животных относительно контрольной группы.

8.4 Аллергическая реакция иммунных комплексов крыс на ферментный препарат *Penicillium verruculosum* ВІ 7.7

Оценку уровня реакции иммунных комплексов половозрелых крыс-самцов линии Wistar на ФП ВІ 7.7 проводили визуально, начиная с 30 минуты после введения разрешающей дозы ФП. На этом сроке никаких проявлений на коже обнаружено не было, также спустя 1, 4 и 24 часа после постановки признаки реакции не были обнаружены. Отсутствие показателей реакции (эритем, инфильтрации и отека кожи, некроза и др.) в опыте и контроле на всех сроках наблюдения позволяет прийти к выводу, что ФП ВІ 7.7 не обладает аллергенными свойствами, выявляемыми в реакции иммунных комплексов.

8.5 Аллергизирующее действие ферментного препарата *Penicillium verruculosum* ВІ 7.7 и вина, полученного с его использованием, при внутрижелудочном введении

На протяжении сенсibilизации животных в течение 42 дней ФП ВІ 7.7 и экстрактом виноматериала признаков аллергической реакции (ранок на коже, изменений в поведении) не наблюдали. После введения крысам внутрижелудочно разрешающей дозы сенсibilизирующих веществ животных всех групп подвергали эвтаназии со взятием мазков крови, результаты анализа которых представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Результаты микроскопического анализа мазков крови крыс, взятых на 49 день исследования аллергизирующего действия ФП ВІ 7.7 и виноматериала, полученного с его использованием.

| Группа животных | Сенсibilизатор | Показатели крови, % от 100 клеток | | | |
|---------------------------|---|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|
| | | Нейтрофилы | Лимфоциты | Макрофаги | Эозинофилы |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>Крысы Norway Brown</i> | | | | | |
| 1 | ФП ВІ 7.7; 350 мг белка/ кг веса | 21,6±1,4 | 76,2±4,2 | 1,4±0,1 | 0,6±0,05 |
| 2 | Экстракт п/сух виноматериала, «Цимлянский Черный»; 35 мг белка/ кг веса | 34,8±2,4 | 61,8±4,8 | 2,8±0,2 | 0,60±0,03 |

Продолжение таблицы 24.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------|---|----------|----------|-----------|-----------|
| 3 | Вода (контроль) | 34,4±2,2 | 63,9±3,4 | 1,30±0,06 | 0,40±0,02 |
| <i>Крысы Wistar</i> | | | | | |
| 1 | ФП VI 7.7; 350 мг белка/ кг веса | 23,8±1,4 | 70,2±4,5 | 3,6±0,2 | 2,4±0,2 |
| 2 | Экстракт п/сух виноматериала, «Цимлянский Черный»; 35 мг белка/ кг веса | 20,8±1,4 | 73,8±3,9 | 2,2±0,1 | 3,2±0,2 |
| 3 | Вода (контроль) | 29±1,5 | 64,8±3,9 | 3,6±0,3 | 2,6±0,1 |

Как видно из данных таблицы, кровь крыс Norway Brown и Wistar, проходивших сенсibilизацию ФП и экстрактом виноматериала, не отличается по составу (процентному содержанию компонентов крови) от крови крыс контрольных групп. Разница в процентном содержании нейтрофилов и лимфоцитов в крови животных в пределах одной группы не превышало 20 %, макрофагов и эозинофилов – 2 %.

Из каждой группы животных выбирали двух, срезы тонкого кишечника которых подвергали гистологическому исследованию с описанием состояния ворсинок, цилиндрического кишечного эпителия, крипт (таблица 25). Обращали внимание на количество интраэпителиальных лимфоцитов в цилиндрическом эпителии и количество лимфоцитов, плазматических клеток, эозинофилов и нейтрофилов в собственной пластинке слизистой оболочки.

Таблица 25 - Описание препаратов срезов тонкого кишечника, прошедших гистологическое исследование.

| Группа животных | Сенсибилизатор | Номер препарата | Описание препарата |
|---------------------------|----------------------------------|-----------------|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>Крысы Norway Brown</i> | | | |
| 1 | ФП VI 7.7; 350 мг белка/ кг веса | 1 | <i>Препарат хорошего качества, рисунок 43 – (1)</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 10 кл на пласт эпителия x40 (незначительно повышены в количестве). В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25 % |

Продолжение таблицы 25.

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------|---|---|--|
| 1 | ФП VI 7.7; 350 мг белка/ кг веса | 2 | <i>Препарат плохого качества, затруднительный для оценки</i> Ворсинки длинные, расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. В собственной пластинке до 5 эозинофилов, ИЭЛ до 10 кл. |
| 2 | Экстракт п/сух виноматериала, «Цимлянский Черный»; 35 мг белка/ кг веса | 3 | <i>Препарат хорошего качества</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 10-15 кл на пласт эпителия х40. В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25 % |
| | | 4 | <i>Препарат нечитабельный (плохого качества)</i> |
| 3 | Вода (контроль) | 5 | <i>Препарат нечитабельный (плохого качества)</i> |
| | | 6 | <i>Препарат хорошего качества, рисунок 43 –(2)</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 10 кл на пласт эпителия х40. В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25 % |
| <i>Крысы Wistar</i> | | | |
| 1 | ФП VI 7.7; 350 мг белка/ кг веса | 7 | <i>Препарат умеренного качества</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 20 кл на пласт эпителия х40 (незначительно повышены в количестве). В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25 % |

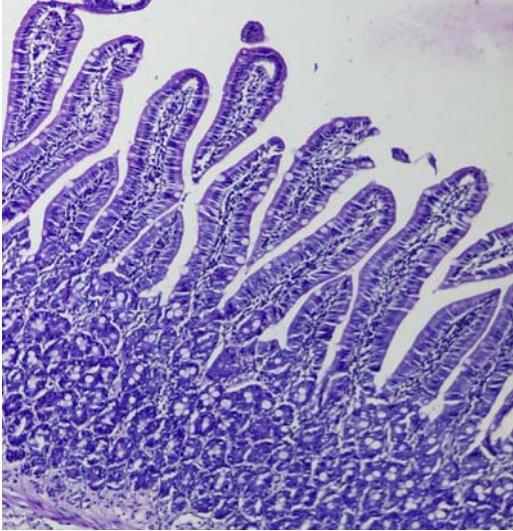
Продолжение таблицы 25.

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|----|--|
| 1 | ФП VI 7.7; 350 мг белка/ кг веса | 8 | <i>Препарат умеренного качества</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 10 кл на пласт эпителия х40. В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25 % |
| 2 | Экстракт п/сух виноматериала, «Цимлянский Черный»; 35 мг белка/ кг веса | 9 | <i>Препарат умеренного качества</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 10 кл на пласт эпителия х40. В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25 % |
| | | 10 | <i>Препарат хорошего качества</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 15 кл на пласт эпителия х40. В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25 % |
| 3 | Вода (контроль) | 11 | <i>Препарат умеренного качества</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 15 кл на пласт эпителия х40. В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25% |
| | | 12 | <i>Препарат умеренного качества</i> Ворсинки длинные, не расширены, эпителий без признаков дегенерации, лимфатические капилляры не расширены. Крипты разделены 1-2 фиброцитами (норма). ИЭЛ до 15 кл на пласт эпителия х40. В собственной пластинке до 5 эозинофилов, лимфоциты и плазматические клетки до 25% |

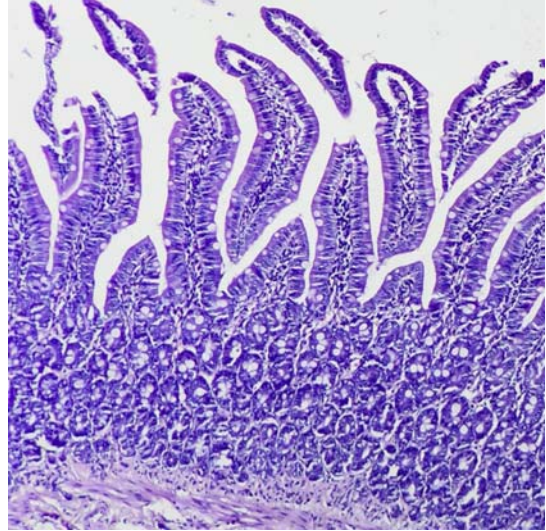
* ИЭЛ – интраэпителиальные лимфоциты.

Описание гистологических препаратов сводится к отсутствию негативного воздействия ФП и экстракта виноматериала (группы крыс № 1 и № 2) на эпителий тонкого кишечника. На рисунке 43 представлены микрофотографии гистологических препаратов крысы Norway Brown из опытной группы № 1, описание к которым представлено ранее в таблице 25.

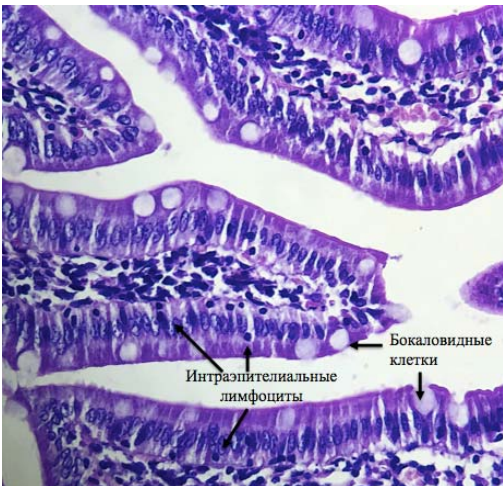
A1



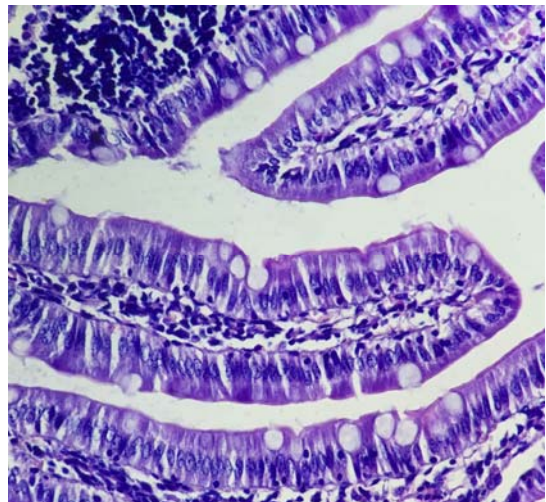
A2



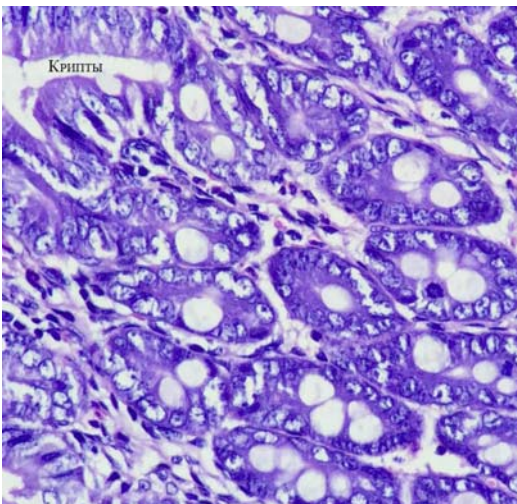
B1



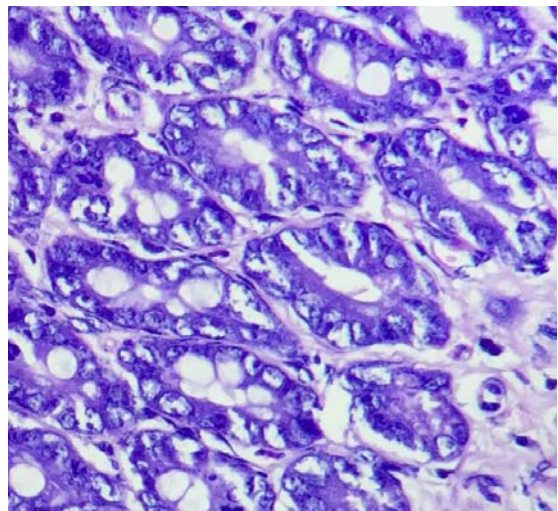
B2



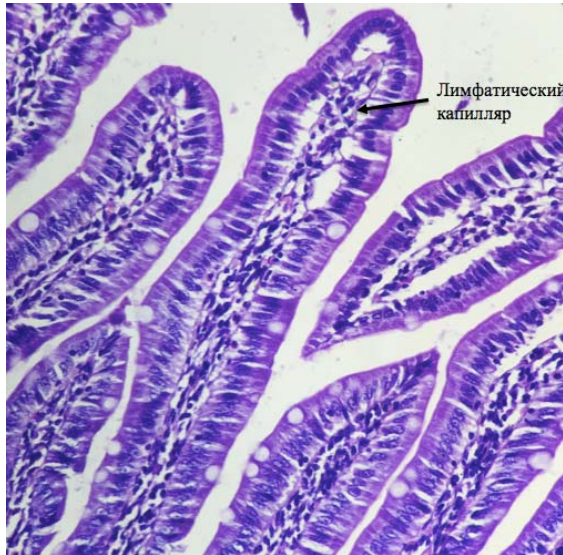
B1



B2



Г1



Г2

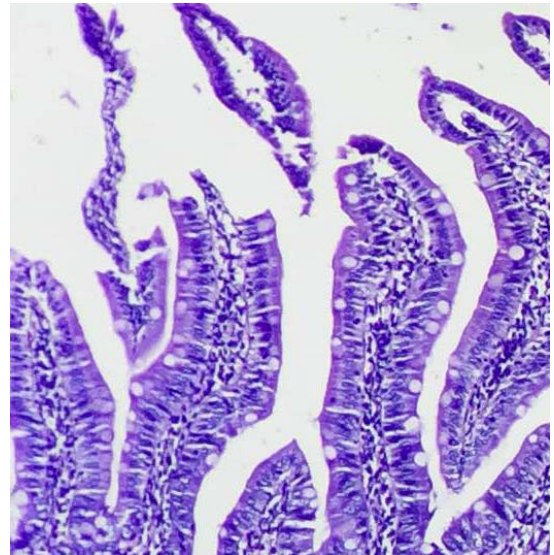


Рисунок 43 - Микрофотографии гистологических препаратов стенки тонкой кишки крыс Norway Brown: (1) – животное, sensibilizированное ФП ВІ 7.7; (2) – животное из контрольной группы. А – внешний вид слизистой оболочки, продольный срез – ворсинки и крипты (окуляр x10, объектив x10); Б – внешний вид ворсинок, покрытых цилиндрическим эпителием, содержащим бокаловидные клетки и интраэпителиальные лимфоциты (окуляр x10; объектив x40); В – крипты, разделенные 1-2 фиброцитами (окуляр x10; объектив x40); Г – ворсинки с центрально расположенным лимфатическим капилляром и лейкоцитами (окуляр x10, объектив x10).

Таким образом, результатам гистологического исследования не было выявлено различий по описанным критериям в группах контроля и опытных группах животных.

Итак, исследования, направленные на выявление токсикологических и алергизирующих свойств ФП ВІ 7.7, показали повышенное содержание в нем афлатоксинов, очистку от которых удалось провести путем ультрафильтрации растворов препарата. По результатам исследования показателей острой токсичности ФП ВІ 7.7 был отнесен к IV классу опасности (вещества малоопасные) по степени воздействия на организм согласно ГОСТ 12.1.007-76, так как полуметальная доза ферментного препарата превысила 5 г/кг веса животного. Влияния ферментного препарата и пути его введения на состояние, внешний вид и функциональные изменения внутренних органов у опытных животных установлено не было. В винах, полученных с помощью неочищенного ФП ВІ 7.7, были обнаружены следовые количества афлатоксинов, присутствие охратоксина А не удалось зафиксировать ввиду его низкого содержания.

Результаты исследования алергенности ФП 7.7 говорят о том, что он не обладает алергизирующими свойствами, выявляемыми в реакции иммунных комплексов. Сенсибилизация крыс ФП ВІ 7.7 и экстрактом виноматериала из винограда сорта «Цимлянский

Черный», полученного с его помощью, посредством внутрижелудочного введения в течение 42 дней с последующим введением разрешающей дозы сенсibilизаторов не выявила признаков аллергической реакции у животных.

ВЫВОДЫ

По результатам выполненной работы можно сделать следующие выводы:

1. С помощью генетически модифицированных штаммов *P. verruculosum* РВ4 и РВ7 получены и охарактеризованы новые ФП ВІ 7.4 (ПЕЛ – 35 %, ЦБГ – 42 %, ЭГ – 10 %, БГЛ – 12 %, другие компоненты – 2 %) и ВІ 7.7 (ПЕЛ – 33 %, ЦБГ – 40 %, ЭГ – 9 %, БГЛ 5 %, другие компоненты – 12 %), содержащие комплекс ферментов, необходимых для эффективной биоконверсии полисахаридов плодового и ягодного сырья.

2. Новые ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7 позволили существенно интенсифицировать деструкцию полисахаридов плодового сырья, вследствие чего на 20-50 % увеличивался выход сока по сравнению с контролем (без применения ферментного препарата) в зависимости от вида сырья. Показана более высокая эффективность обработки винограда новыми ФП по сравнению с коммерческими аналогами (ФП серии «Тренолин») с точки зрения увеличения выхода самотечной фракции сока из мезги. Увеличение выхода виноградного сусла в случае применения ФП ВІ 7.7 составило 40 % относительно контрольного образца (без ФП), тогда как максимальный прирост сусла при использовании коммерческих ФП достигал 30 %.

3. Изготовлен ряд образцов вин, в технологию которых включена стадия обработки сырья полученными в работе новыми ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7. По сравнению с контрольными образцами вин, в опытных образцах вин, полученных без использования ФП, не выявлено негативного влияния ферментативной обработки на физико-химические свойства полупродуктов (сладкое сусло) и виноматериалов. Вина, изготовленные с помощью новых ФП, обладали более низкой вязкостью, меньшим содержанием летучих кислот, высокой цветностью, в ферментированном сусле зафиксировано меньшее содержание взвесей по сравнению с контрольными образцами. Вина, обработанные новыми лабораторными ФП, обладали более высокими органолептическими показателями.

4. Выявлена возможность использования новых ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7 для получения из отходов винодельческого производства (сброженные выжимки технических красных сортов винограда) экстрактов, обогащенных веществами фенольной природы (галловой, ванилиновой, 2-гидроксифенилуксусной кислотами, пирокатехином и др.), которые были обнаружены в составе экстрактов методом ВЭЖХ. Также было показано присутствие в экстрактах, получаемых с помощью новых ФП, сахаров в количестве более 5 г/л.

5. Определены показатели токсичности и алергизирующие свойства ФП ВІ 7.7, проявившего высокую гидролитическую способность для наиболее широкого спектра плодов различного состава. В сухом лабораторном ФП ВІ 7.7, представляющем собой лиофилизат КЖ микроскопического гриба *P. verruculosum*, были обнаружены афлатоксины, а также некоторое количество охратоксина А. Фиксируемое количество афлатоксинов в виноградных винах,

полученных с помощью неочищенного ФП, из сортов «Цимлянский Черный», «Изабелла» и «Ркацителли» было близко к пределу обнаружения методом ИФА и составляло от 30 до 50 нг/л. Охратоксин А обнаруживался в ряде виноматериалов в следовых количествах, близких к пределу детектирования (от 10 до 15 нг/л). В водном растворе ФП ВІ 7.7, прошедшем стадию ультрафильтрации, присутствия охратоксина А и афлатоксинов не обнаружено. В винах, полученных с помощью очищенного ФП ВІ 7.7, указанные микотоксины отсутствовали.

6. ФП ВІ 7.7 не обладал аллергизирующими свойствами, выявляемыми в реакции иммунных комплексов. Сенсibilизация крыс ФП ВІ 7.7 и экстрактом виноматериала, полученного с его помощью, не оказывала негативного влияния на эпителий тонкого кишечника посредством внутрижелудочного введения в течение 42 дней, компонентный состав крови крыс не показал различий между опытными и контрольной группами животных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joshi V.K., Sandhu D.K., Thakur N.S. Fruit based alcoholic beverages // *Biotechnology: Food Fermentation*. –2000. –V. 2. V.K. –P. 647-732.
2. Мехузла М.А., Панасюк А.Л. Плодово-ягодные вина // –М.: Легкая и пищевая промышленность. –1984. –С. 240.
3. Севодина К.В., Рожнов Е.Д., Севедин В.П. Формирование потребительских свойств облепиховых вин // *Хранение и переработка сельхозсырья*. –2013. –№ 2. –С. 32-34.
4. Alberti A., Braga C.M., Jaster H., Nogueira A. Dissolved oxygen content in apple must: technological implications in cider processing // *J. Inst. Brew.* –2014. –V. 120. –P. 65-70.
5. Lund S.T., Bohlmann J. The molecular basis for wine grape quality – a volatile subject // *Science*. –2006. –V. 311. –P. 804-805.
6. Кишковский З.Н., Мержаниан А.А. Технология вина // – М.: Легкая и пищевая промышленность. –1984. –С. 239-247.
7. Hornsey I. S. *The chemistry and biology of winemaking*. – Royal Society of Chemistry. –2007. – P. 170-174.
8. Методы технохимического контроля в виноделии // Под ред. В. Г. Гержиковой. 2-е изд. - Симферополь: Таврида. –2009. –С. 304.
9. Ajayi A.A., Osunlalu E.O., Peter-Albert C.F., Adejuwon A.O. Studies on pectinolytic and proteolytic enzymes from deteriorated grapes (*Vitis vinifera*) // *Covenant Journal of Physical and Life Sciences*. –2014. –V. 1. –№ 2. –P. 1-15.
10. Mulero J., Zafrilla P., Cayuela J.M., Martínez-Cachá A., Pardo Francisco. Antioxidant activity and phenolic compounds in organic red wine using different winemaking techniques // *Journal of Food Science*. –2011. –V. 76. –№ 3. –P. 436-440
11. Hornsey I. S. *The chemistry and biology of winemaking*. – Royal Society of Chemistry. –2007. – P. 161-169.
12. Hornsey I. S. *The chemistry and biology of winemaking*. – Royal Society of Chemistry. –2007. – P. 193.
13. Apolar-Valiente R., Romero-Cascales I., Gómez-Plaza E., López-Roca J.M., Ros-García J.M. Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques // *Food Chemistry*. –2015. –V. 187. –P. 89-97.
14. Negro G., Hannan M.T., Rao H. Category reinterpretation and defection: modernism and tradition in Italian winemaking // *Organization Science*. –2011. –V. 22. –№ 6. –P. 1449-1463.
15. Кишковский З.Н., Мержаниан А.А. Технология вина. // М.: Легкая и пищевая промышленность. –1984. –С. 254-263.

16. Apolinar-Valiente R., Romero-Cascales I., Williams P., Gómez-Plaza E., López-Roca J.M., Ros-García J.M., Doco T. Effect of winemaking techniques on polysaccharide composition of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines // *Australian Journal of Grape and Wine Research*. –2014. –V. 20. –P. 62-71.
17. Алексеенко Е.В. Инновационные технологии переработки ягодного сырья: научные и прикладные аспекты. Автореферат на соискание ученой степени доктора технических наук. –2013.
18. Bartowsky E.J., Henschke P.A. Acetic acid bacteria and wine: all is well until oxygen enters the scene // *Winemaking. The Australian Wine Research Institute (AWRI)-Annual Technical Issue*. – 2004. –P. 86-91.
19. Chauhan S.K., Tyagi S.M., Singh D. A pectinolytic liquefaction of apricot, plum, and mango pulps for juice extraction // *International Journal of Food Properties*. –2001. –V. 4. –№ 1. –P. 103-109.
20. Mieszczakowska-Fraç M., Markowski J., Zbrzeźniak M., Płocharski W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices // *Food Science and Technology*. –2012. –V. 49. –P. 251-256.
21. Shah N. Optimization of an enzyme assisted process for juice extraction and clarification from litchis (*Litchi chinensis Sonn.*) // *International Journal of Food Engineering* –2007. –V. 3. –№ 3. – P. 1-17.
22. Singh A., Kumar S., Sharma H.K. Effect of enzymatic hydrolysis on the juice yield from bael fruit (*Aegle marmelos Correa*) pulp // *American Journal of Food Technology*. –2012. –V. 7. –№ 2. –P. 62-72.
23. Liewabdullah A.G., Sulaiman N.M., Aroua M.K., Megat Mohd Noor M.J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme // *Journal of Food Engineering* –2007. –V. 81. –P. 65–71.
24. Mantovani C.F., Geimba M.P., Brandelli A. Enzymatic clarification of fruit juices by fungal pectin lyase // *Food Biotechnology*. –2005. –V. 19. –P. 173-181.
25. Sandri I.G., Fontana R.C., Barfknecht D.M., Silveira M.M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases // *Food Science and Technology*. –2011. –V. 44. –P. 2217-2222.
26. Кожухова М.А., Теркун А.Н., Рожков С.Е. Биотехнологические методы в производстве плодовоовощных соков и нектаров // *Известия вузов. Пищевая промышленность*. –2003. – № 4. –С. 5-7.
27. Landbo A. K., Kaack K., Meyer, A. S. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of

- elderberry juice // *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. –2007. –V. 8. –P. 135-142.
28. Vaillant F., Millan A., Dornier M., Decloux M., Reynes M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration // *Journal of Food Engineering*. –2001. –V. 48. –P. 83-90.
29. Alvarez S., Alvarez R., Riera F.A., Coca J. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. –1998. –V. 138. –P. 377-382.
30. Sharma H.P., Patel H., Sharma S. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruit-A review // *Trends in post harvest technology*. –2014. –V. 2. –№ 1. –P. 01-14.
31. Xu S., Qin X., Liu B., Zhang D., Zhang W., Wu K., Zhang Y. An acidic pectin lyase from *Aspergillus niger* with favorable efficiency in fruit juice clarification // *Letters in applied microbiology*. –2015. –V. 60. –№ 2. –P. 181-187.
32. Sin H.N., Yusof S., Hamid N.S.A., Rahman R.A. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology // *Journal of Food Engineering* –2007. –V. 73. –P. 313–319.
33. Gao Y., Fangel J.U., Willats W.G.T., Vivier M.A., Moore J.P. Dissecting the polysaccharide-rich grape cell wall changes during winemaking using combined high-throughput and fractionation methods // *Carbohydrate Polymers*. –2015. –V. 133. –P. 567-577.
34. Rogerson F., Vale E., Grande H., Silva M. Alternative processing of port-wine using pectolytic enzymes // *CyTA – Journal of Food*. –2000. –V. 2. –№ 5. –P. 222-227.
35. Levaj B., Vahcic N., Dragovic-Uzelac V., Svetlicic S., Sabljak V., Herceg K., Stanic D., Marincic D., Elez I., Kovacevic D. B., Loncaric S. Influence of Processing on Yield and Quality of Cloudy Plum Juices // *Croatian Journal of Food Technology*. –2012. –V. 7. –P. 34-38.
36. Панасюк А.Л., Егорова О.С., Харламова Л.Н. Состав кислот в винах из красной рябины при разных способах их приготовления // *Виноградарство и виноделие*. –2006. –№ 9. –С. 36.
37. Bautista-Ortín A.B., Martínez-Cutillas A., Ros-García J.M., López-Roca J.M., Gómez-Plaza E. Improving color extraction and stability in red wines: The use of maceration enzymes and enological tannins // *International Journal of Food Science & Technology*. –2005. –V. 40. –P. 867-878.
38. Darra N.E., Turk M. F., Ducasse M.A., Grimi N., Maroun R.G., Louka N., Vorobiev E. Chages in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments // *Food Chemistry*. –2015. –V. 194. –P. 944-950.

39. Aguiló-Aguayo I., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. Color and viscosity of watermelon juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat // *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. –2010. –V. 11. –№ 2. –P. 299-305.
40. Ortega-Heras M., Pérez-Magariño S., González-Sanjosé M.L. Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencia red wine // *Food Science and Technology*. –2012. –V. 48. – P. 1-8.
41. Сергеева И. Ю., Помозова В. А., Шевченко Т.В. Применение флокулянтов для повышения стойкости сброженных напитков // *Пиво и напитки*. –2007. –№ 5. – С. 24-27.
42. Сергеева И.Ю. Классификация стабилизирующих средств, используемых в индустрии напитков // *Техника и технология пищевых производств*. –2013. –№ 4. –С. 78-86.
43. Шатиришвили Ш.И., Махароблидзе М.Р., Чхиквадзе Х.Ш., Церетели Б.С. Влияние различных технологических способов и оклеивающих материалов на коллоидную стабильность вина // *Известия аграрной науки*. –2011. –№ 3. –С. 94–96.
44. Николашкин, Ф.В. Осветление сусла и пива силиказолем // *Пиво и напитки*. –2004. –№ 1. – С. 28-29.
45. Bonner J., Varner J. E. (ed.). *Plant biochemistry* // Elsevier. –2012. –P. 20-22.
46. Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*. – 1998. –V. 118. –P. 783–792.
47. Ortega-Regules A. E., Ros-García J. M., Bautista-Ortín A. B., López-Roca J. M., Gómez-Plaza E. Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera*, L.): technological implications // *European Food Research and Technology*. –2008. –V. 227. –P. 223–231.
48. Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // *Carbohydrate Research*. –2009. –V. 344. –P. 1879-1900.
49. Albersheim P., Darvill A., Roberts K., Sederoff R., Staehelin A. Biochemistry of the cell wall molecules // *Plant Cell Walls from Chemistry to Biology*. –2011. –P. 68-118.
50. Marcus, S.E., Verhertbruggen Y., Hervé C., Ordaz-Ortiz J.J., Farkas V., Pedersen H.L. et al. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls // *BMC Plant Biology*. –2008. –V. 8. –P. 60.
51. Apolinar-Valiente R., Romero-Cascales I., Gómez-Plaza E., López-Roca J. M., Ros-García J. M. The composition of cell walls from grape marcs is affected by grape origin and enological technique // *Food Chemistry*. –2015. –V. 167. –P. 370–377.

52. Popper Z. A. et al. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants // *Annual review of plant biology*. –2011. –Т. 62. –Р. 567-590.
53. Hilz H., Bakx E. J., Schols H. A., Voragen A. G. J. Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries characterization in berries, juice and press cake // *Carbohydrate Polymers*. –2005. –V. 59. –№ 4. –Р. 477-488.
54. Zietsman A. J. J., Moore J. P., Fangel J. U., Willats W. G. T., Trygg J., Vivier M. A. Following the compositional changes of fresh grape skin cell walls during the fermentation process in the presence and absence of maceration enzymes // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. –2015. –V. 63. –Р. 2798–2810.
55. Донченко Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов. –М. Дели. –2000. –С. 190.
56. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis // *Current Opinion in Plant Biology*. –2008. –V. 11. –Р. 266-277.
57. Vincken J., Schols H.A., Oomen R.J.F.J., McCann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J., Visser R.G.F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture // *Plant Physiology*. –2003. –V. 132. –Р. 1781-1789.
58. Combo A.M.M., Aguedo M., Goffin D., Wathelet B., Paquot M. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations // *Food and Bioproducts processing*. –2012. –V. 90. –Р. 588-596.
59. Whitaker J.R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. Review // *Enzyme and Microbial Technology*. –1984. –V. 6. –Р. 341-349.
60. Pinelo M., Zeuner B., Meyer A.S. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice Turbidity // *Food and Bioproducts Processing*. –2010. –V. 88. –Р. 259-265.
61. Thomas L.H. et al. Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma // *Plant physiology*. –2013. –Т. 161. –№ 1. –Р. 465-476.
62. Chang M.M.Y. Crystallite structure of cellulose // *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*. –1974. –Т. 12. –№ 7. –Р. 1349-1374.
63. Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses // *Plant Biology*. –2010. –Т. 61. –№ 1. –Р. 263.
64. Gu J., Catchmark J.M. The impact of cellulose structure on binding interactions with hemicellulose and pectin // *Cellulose*. –2013. –Т. 20. –№ 4. –Р. 1613-1627.
65. Held M.A. et al. Plant Cell Wall Polysaccharides: Structure and Biosynthesis // *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. –2015. –Р. 3-54.
66. Meier H., Reid J.S.G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants // *Plant carbohydrates I*. Springer Berlin Heidelberg. –1982. –Р. 418-471.

67. Zietsman A.J.J., Moore J.P., Fangel J.U., Willats W.G.T., Vivier M.A. Profiling the hydrolysis of isolated grape berry skin cell walls by purified enzymes // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. –2015. –V. 63. –P. 8267-8274.
68. Puri M., Sharma D., Barrow C.J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants // *Trends in Biotechnology*. –2012. –V. 30. –№ 1. –P. 37-44.
69. Romero-Cascales I., Ros-García J.M., López-Roca J.M., Gómez-Plaza E. The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process // *Food Chemistry*. –2012. –V. 130. –P. 626-631.
70. Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review // *Process Biochemistry*. –2003. –V 40. –P. 2931-2944.
71. Yadav S., Yadav P.K., Yadav D., Yadav K.D.S. Pectin-lyase: a review // *Process Biochemistry*. –2009. –V. 44. –P. 1-10.
72. de Vries R.P., Visser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. –2001. –V. 65. –P. 497-522.
73. Will F., Ludwig M., Dietrich H., Schulz K., Otto K. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice // *International Journal of Food Science and Technology*. –2002. –V. 37. –P. 653–660.
74. Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // *Biotechnology Advances*. –2000. –V. 18. –P. 355-383.
75. Abbes F., Bouaziz M., Blecker C., Masmoud M., Attia H., Besbes S. Date syrup: Effect of hydrolytic enzymes (pectinase/cellulase) on physicochemical characteristics, sensory and functional properties // *Journal of Food Science and Technology*. –2011. –V. 44. –P. 1827-1834.
76. Prathyusha K., Suneetha V. Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing juice production industry: a review // *Journal of Phytochemistry*. –2011. –V. 3. –№ 6. –P. 16-19.
77. Baffi M.A., Tobal T., Lago J. H., Boscolo M., Gomes E., Da-Silva R. Wine aroma improvement using a β -Glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans* // *Appl Biochem Biotechnol*. –2013. –V. 169. –P. 493-501.
78. Baffi M.A., Tobal T., Lago J.H.G., Leite R.S.R., Boscolo M., Gomes E., Da-Silva R. A novel β -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and application in winemaking // *Journal of Food Science*. –2011. –V. 76. –№ 7. –P. 997-1002.
79. Demir N., Nadaroglu H., Tasgin E., Adiguzel A., Gulluce M. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its application in fruit juice production // *Annals of Microbiology*. –2011. –V. 61. –P. 939-946.

80. Adapa V., Ramya L.N., Pulicherla K.K., Sambasiva Rao K.R.S. Cold active pectinases: advancing the food industry to the next generation // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2013. –V. 172. –№ 5. –P. 2324-2337.
81. Joshi A.A., Kshirsagar R.B. and Sawate A.R. Studies on standardization of enzyme concentration and process for extraction of tamarind pulp, variety Ajanta // *Journal Food Processing and Technology*. –2012. –V. 3. –№ 2. –P. 1-3.
82. Vaidya D., Vaidya M., Sharma S., Ghanshayam V. Enzymatic treatment for juice extraction and preparation and preliminary evaluation of Kiwifruits wine // *Natural Product Radiance*. –2009. – V. 8. –№ 4. –P. 380-385.
83. Nur 'Aliaa A.R., Siti Mazlina M.K., Taip F.S. Effects of commercial pectinases application on selected properties of red pitaya juice // *Journal of Food Process Engineering*. –2011. –V. 34. –P. 1523-1534.
84. Samira B., Mehrdad A., Mohammad C., Abbas G. Optimization of Enzymatic Extraction of Sugars from // *Middle-East Journal of Scientific Research*. –2011. –V. 7. –№ 2. –P. 211-216.
85. Demir N., Acar J., Sarioglu K., Mutlu M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment // *Journal of Food Engineering*. –2001. –V. 47. –P. 275-280.
86. Tapre A.R., Jain R.K. Pectinases: enzymes for fruit processing industry // *International Food Research Journal*. –2014. –V. 21. –№ 2. –P. 447-453.
87. Vijayanand P., Kulkarni S.G., Prathibha G.V. Effect of pectinase treatment an concentration of litchi juice on quality characteristics of litchi juice // *Journal of Food Science Technology*. –2010. –V. 47. –P. 235–239.
88. Alvarenga A.E., Romero C.M., Castro G.R. A novel α -L-rhamnosidase with potential applications in citrus juice industry and in winemaking // *European Food Research and Technology*. –2013. –V. 237. –№ 6. –P. 977-985.
89. Pasha K.M., Anuradha P., Subbarao D. Applications of pectinases in industrial sector. Review Paper // *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*. –2013. –V. 16. –№ 1. –P. 89-95.
90. Byarugaba-Bazirake G.W., Rensburg P., Kyamuhangire W. The influence of commercial enzymes on wine clarification and on the sensory characteristics of wines made from three banana cultivars // *American Journal of Biotechnology and Molecular Sciences*. –2013. –V. 3. –№ 2. –P. 41-62.
91. Mojsov K., Ziberoski J., Bozinovic Z. The effect of pectolytic enzyme treatments on red grapes mash of Vranec on grape juice yields // *International Cross-Industry Journal*. –2011. –V. 7. –№ 1. –P. 84-86.

92. Sieiro C., García-Fraga B., Lopez-Seijas J., Da Silva A. F., Villa T.G. Microbial pectic enzymes in the food and wine industry // *Food industrial processes - Methods and Equipment*. –2010. –P. 201-218.
93. Алексеенко Е.В., Чернобровина А.Г., Траубенберг С.Е., Осташенкова Н.В., Куликова Н.Е. Исследование условий ферментативного гидролиза ягод красной смородины // *Хранение и переработка сельхозсырья*. –2011. –№ 10. –С. 43-44.
94. Antoce A.O. Influence of maceration enzyme treatment on the colour and volatile profile of two red Romanian wines // *Revista de Chimie*. –2012. –V. 63. –№ 9. –P. 859-864.
95. Busse-Valverde N., Gómez-Plaza E., López-Roca J. M., Gil-Muñoz R., Bautista-Ortín A. B. The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. –2011. –V. 59. –P. 5450–5455.
96. Armada L., Fernández E., Falqué E. Influence of several enzymatic treatments on aromatic composition of white wines // *LWT - Food Science Technology*. –2010. –V. 43. –№ 10. –P. 1517-1525.
97. Canal-Llauberes R., Pouns J. Les enzymes de maceration en vinification en rouge. Influence d'une nouvelle preparation sur la composition des vins // *Revue des Oenologues*. –2000. –V. 104. –P. 29-31.
98. Ducasse M.A., Canal-Llauberes R.M., Lumley M.D., Williams P., Souquet J.M., Fulcrand H., Doco T., Cheynier V. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines // *Food Chemistry*. –2010. –V. 118. –P. 369–376.
99. Apolinar-Valiente R., Williams P., Mazerolles G., Romero-Cascales I., Gómez-Plaza E., López-Roca J.M., Ros-García J.M., Doco T. Effect of enzyme additions on the oligosaccharide composition of Monastrell red wines from four different wine-growing origins in Spain // *Food Chemistry*. –2014. –V. 156. –P. 151-159.
100. Ducasse M.A., Williams P., Canal-Liauberes R.M., Mazerolles G., Cheynier V., Doco T. Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. –2011. –V. 59. –P. 6558-6567.
101. Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review // *Bioresource Technology*. –2001. –V. 77. –P. 215-227.
102. Demir N., Acar J., Sario K., Mutlu M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: immobilized pectinase for mash treatment // *Journal of Food Engineering*. –2000. –V. 47. –P. 275–280.

103. Sandri I.G., Lorenzoni C.M.T., Fontana R.C., Silveira M.M. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice // Food Science and Technology. –2013. –V. 51. –P. 469-475.
104. Pal A., Khanum F. Efficacy of xylanase purified from *Aspergillus niger* DFR-5 alone and in combination with pectinase and cellulase to improve yield and clarity of pineapple juice // Journal of Food Science Technology. –2011. –V. 48. –№ 5. –P. 560-568.
105. Ahmad I., Jha Y.K., Anurag R.K. Optimization of enzymic extraction process for higher yield and clarity of guava juice // Journal of Food Science Technology. –2009. –V. 46. –№ 4. –P. 307–311.
106. Abdullah A. G. L., Sulaiman N.M., Aroua M. K., Noor M. J.M.M. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme // Journal of Food Engineering. –2007. –V. 81. –P. 65–71.
107. Toaldo I.M., Gois J.S., Fogolari O., Hamann D., Borges D.L.G., Bordignon-Luiz M.T. Phytochemical polyphenol extraction and elemental composition of *Vitis labrusca* L. grape juices through optimization of pectinolytic activity // Food and Bioprocess Technol. –2014. –V. 7. –№ 9. –P. 2581-2594.
108. Ali A., Essa H. Effect of pectinase enzyme treatment on the rheological, physical and chemical properties of plum, banana and guava juices // Journal of Food and Nutrition Sciences. –2002. –V. 11/52. –№ 3. –P. 13-19.
109. Sherpa K., Mahato S.K., Kumar K.R., Chhetri B., Subba P., Paul P.K. Assessment of quality characteristics upon enzymes assisted juice extraction from plum // An International Quarterly Journal of Life Sciences. –2014. –V. 9. –№ 3. –P. 1081-1086.
110. Allewell N.M. Thematic minireview series on enzyme evolution in the post-genomic era // Journal of Biology Chemistry. –2012. –V. 287. –P. 1-2.
111. Li S., Yang X., Yang S., Zhu M., Wang X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering // Computational and Structural Biotechnology Journal. –2012. –V. 2. –№ 3. –P. 01-11.
112. Sanchez S., Demain A.L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance // Organic Process Research and Development. –2011. –V. 15. –P. 224-230.
113. Grassin C., Van der Weijden C., van der Hoeven R. A. M., van Dijck P., de Boer W. R. Composition of commercial enzyme preparations used in industry // Scientific Technical Magazine for Fermentation-and Fruit and Vegetable Industry. –2005. –V. 8. –№ 9. –P. 42-45.
114. Duza M.B., Mastan D.S.A. // Microbial enzymes and their applications: a review // Indo American Journal of Pharmaceutical Research. –2013. –V. 3. –№ 8. –P. 9357-9368.

115. Wikiera A., Mika M., Grabacka M. Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction // *Food Hydrocolloids*. –2015. –V. 44. –P. 156-161.
116. Lara-Marquez A., Zavala-Paramo M.G., Lopez-Romero E., Camacho H.C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi // *Biotechnology Letters*. –2011. –V. 33. –P. 859-868.
117. Будаева В.В. Экологически безопасный способ получения, состав и свойства биологически активных экстрактов из отходов плодово-ягодной переработки: дис. канд. хим. наук. – Барнаул: АГУ. –2005. –С. 20.
118. Гваладзе Г.Д. Безотходная комплексная технология переработки плодов граната // *Пищевая промышленность*. –2010. –№ 7. –С. 12-13.
119. Влащик Л.Г. Виноградный пектиновый экстракт для напитков // *Виноделие и виноградарство*. –2002. –№ 4. –С. 20-21.
120. Басий Н.А. Обоснование комплексной переработки виноградных семян с получением пищевого масла // *Известия вузов. Пищевая технология*. –2004. –№ 1. –С. 44-45.
121. Егорова Е.Ю. Комплексная переработка плодово-ягодного сырья: методические подходы // *Хранение и переработка сельхозсырья*. –2012. –№ 5. –С. 12-15.
122. Sowbhagya H. B., Chitra V. N. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. –2010. –V. 50. –P. 146-161.
123. Рыжова Н.В., Иванова Л.А., Мураенко Е.Н. Совершенствование способов экстракции красящих веществ из растительного сырья // *Хранение и переработка сельхозсырья*. –2006. –№ 5. –С. 17-18.
124. Bautista-Ortín A.B., Jiménez-Pascual E., Busse-Valverde N., López-Roca J.M., Ros García J.M., Gómez-Plaza E. Effect of wine maceration enzymes on the extraction of grape seed proanthocyanidins // *Food Bioprocess Technology*. –2013. –№ 6. –P. 2207-2212.
125. Шичкина Е.С., Болотов В.М. Влияние ферментных препаратов на выход красящих веществ при получении натуральных красителей // *Хранение и переработка сельхозсырья*. –2013. –№ 1. –С. 46-47.
126. Chamorro S., Viveros A., Alvarez I., Vega E., Brenes A. Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment // *Food Chemistry*. –2012. –V. 133. –P. 308-314.
127. Rockenbach I.I., Gonzaga L.V., Rizelio V.M., Souza Schmidt Goncalves A.E., Genovese M.I., Fett R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking // *Food Research International*. – 2011. –V. 44. –P. 897-901.

128. Zykwincka A., Boiffard M.-H., Kontkanen H., Buchert J., Thibault J.-F., Bonnin E. Extraction of green labeled pectins and pectic oligosaccharides from plant byproducts // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. –2008. –V. 56. –P. 8926–8935.
129. Martínez M., Gullon B., Yáñez R., Alonso J.L., Parajó J.C. Direct enzymatic production of oligosaccharide mixtures from sugar beet pulp: experimental evaluation and mathematical modeling // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. –2009. –V. 57. –P. 5510–5517.
130. Concha Olmos J., Zúñiga Hansen M.E. Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates // *Chemical Engineering Journal*. –2012. –V. 192. –P. 29-36.
131. Kumar Y.S., Kumar P.V., Reddy O.V.S. Pectinase production from mango peel using *Aspergillus foetidus* and its application in processing of mango juice // *Food Biotechnology*. –2012. –V. 26. –P. 107-123.
132. Belén Días A., d'Ory I., Caro I., Blandino A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace // *Food and Bioproducts Processing*. –2012. –V. 90. –P. 72-78.
133. Díaz A.B., Caro I., de Ory I., Blandino A. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace // *Enzyme and Microbial Technology*. –2007. –V. 41. –P. 302–306.
134. Mamma D., Kourtoglou E., Christakopoulos P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry // *Bioresource Technology*. –2008. –V. 99. –P. 2373–2383.
135. Belén Días A., Alvarado O., d'Ory I., Caro I., Blandino A. Valorization of grape pomace and orange peels: Improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice // *Food and Bioproducts Processing*. –2013. –V. 91. –№ 4. –P. 580-586.
136. Joshi V.K., Parmar M., Rana N. Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficiency in fruit juice extraction and clarification // *Indian Journal of Natural Products and Resources*. –2011. –V. 2. –№ 2. –P. 189-197.
137. Bushina E.V., Rozhkova A.M, Zorov I.N., Satrutdinov A.D., Bekkarevich A.O., Koshelev A.V., Okunev O.N., Sinitsyn A.P. Creation of complex enzymatic preparations pectinases and cellulases for processing of sugar beet pulp. *Applied Biochemistry and Microbiology*. –2012. –T. 48. –P. 543-549.
138. Пат. 2574206 Российская Федерация, МПК⁵¹ C 12 N 1/15, C 12 N 15/63, C 12 N 9/24, C 12 G 1/022. Новый рекомбинантный штамм (варианты) мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* и ферментный препарат (варианты), предназначенный для гидролиза плодово-ягодного сырья, и способ его получения / Синицын А.П., Рожкова А.М., Зоров

И.Н., Синицына О.А., Бушина Е.В., Волчок А.А., Матыс В.Ю., Окунев О.Н., Черноглазов В.М., заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственная компания «Фермтек» – № 2014139811/10. заявл. 02.10.14, опубл. 10.02.16, Бюл. № 4. – 8 с.

139. Nelson N. Photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose // *Journal of Biological Chemistry*. –1944. –V. 153. –P. 375-379.
140. Somogyi M. Notes on sugar determination // *Journal of Biological Chemistry*. –1952. –V. 195. – P. 19-23.
141. ГОСТ Р 51653-2000. Алкогольная продукция и сырье для ее производства. Метод определения объемной доли этилового спирта. – Введ. 2000-10-24. –М.: Изд-во стандартов, 2000. – 2-5 с.
142. ГОСТ Р 51621-2000. Алкогольная продукция и сырье для ее производства. Методы определения массовой концентрации титруемых кислот. – Введ. 2000-06-27. –М.: Изд-во стандартов, 2000. – 4-6 с.
143. ГОСТ Р 51654-2000. Алкогольная продукция и сырье для ее производства. Метод определения массовой концентрации летучих кислот. – Введ. 2000-10-24. –М.: Изд-во стандартов, 2000. – 4-7 с.
144. ГОСТ Р 51620-2000. Алкогольная продукция и сырье для ее производства. Метод определения массовой концентрации приведенного экстракта. – Введ. 2000-06-27. –М.: Изд-во стандартов, 2000. – 3-7 с.
145. ГОСТ Р 51655-2000. Алкогольная продукция и сырье для ее производства. Метод определения массовой концентрации свободного и общего диоксида серы. – Введ. 2000-10-24. –М.: Изд-во стандартов, 2000. – 3-5 с.
146. ГОСТ 26889-86. Продукты пищевые и вкусовые. Общие указания по определению содержания азота методом Кьельдаля. – Введ. 1986-11-07. –М.: Изд-во стандартов, 1986. – 3-7 с.
147. Мехузла Н.А. Сборник международных методов анализа и оценки вин и сусел. –М.: Пищевая промышленность. –1993. –С. 319.
148. Francesca N., Chiurazzi M., Romano R., Aponte M., Settani L., Moschetti G. Indigenous yeast communities in the environment of «Rovello bianco» grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. –2010. –V. 26. –P. 337-351.
149. ГОСТ Р 52813-2007. Продукция винодельческая. Методы органолептического анализа. – Введ. 2007-12-27. –М.: Изд-во стандартов, 2007. – 3-10 с.

150. Laboissière L.H.E.S., Deliza R., Barros-Marcellini A.M., Rosenthal A., Camargo L.M.A.Q., Junqueira R.G. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on sensory characteristics of yellow passion fruit juice // *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. –2007. –V. 8. –P. 469–477.
151. Baxter I.A., Easton K., Scheebeli K., Whitfield F.B. High pressure processing of Australian novel orange juices: sensory analysis and volatile flavor profiling // *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. –2005. –V. 6. –P. 372–387.
152. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Государственное издательство медицинской литературы. –1963. –С. 81-105.
153. Шабанов А.Н. Медицинский справочник для фельдшеров. –М.: Медицина. –1984. –С. 545-547.
154. Paget L.E., Barnes J. Toxicity Tests // *Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics*. –1964. –V. 1. –P. 135-165.
155. ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – Введ. 1976-03-10. –М.: Изд-во стандартов, 1976. – 2-5 с.
156. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Министерство здравоохранения и социального развития РФ. ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения. –2012. –С. 16.
157. Xu-Dong Jia, Ning Li, Yong-Ning Wu, Xiao-Guang Yang. Studies on BN rats model to determine the potential allergenicity of proteins from genetically modified foods. *World Journal of Gastroenterology*. 2005. –V. 11. –№ 34, –P. 5381-5384.
158. Na Sun, Cui Zhou, Qiankun Pu, Joing Wang, Kunlun Huang, Huilian Che. Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin. *Journal of Immunotoxicology*. –2013. –V. 10. –№ 1. –P. 67-74.
159. Day MJ, Bilzer T, Mansell J, Wilcock B, Hall EJ, Jergens A, Minami T, Willard M, Washabau R. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group // *Journal of Comparative Pathology*. –2008. –V. 138. –P. 1-43.
160. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии. –М.: Мир. –1994. –С. 30-39, 97-104, 114-125.
161. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. –М.: Государственное издательство медицинской литературы. –1963. –С. 23-31.

162. Бушина Е.В. Новые высокоэффективные ферментные препараты для гидролиза пектин- и целлюлозосодержащих субстратов на основе рекомбинантных штаммов грибов рода *Penicillium*: дис. канд. хим. наук. –Москва: МГУ им. М.В. Ломоносова. –2012. –С. 114-118.
163. Яровенко В.Л., Калунянц К.А., Голгер Л.И.. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий. –М.: Пищевая промышленность. –1970. –С. 120-122.
164. Остроумов Л.А., Кригер О.В., Карчин К.В., Щетинин М.П. Исследование химического состава плодов рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia*), произрастающей в Кемеровской области // Техника и технология пищевых производств. –2014. –№ 4. –С. 38-41.
165. Кушнерева Е.В., Гугучкина Т.И., Якуба Ю.Ф., Панкин М.И., Лукьянов А.А., Максимов Р.А. Формирование качества столовых красных вин при обработке мезги ферментными препаратами // Виноделие и Виноградарство. –2013. –№ 6. –С. 25-29.
166. ГОСТ Р 52523-2006. Вина столовые и виноматериалы столовые. Общие технические условия. – Введ. 2006-02-28. –М.: Изд-во стандартов, 2006. – 3-10 с.
167. ГОСТ Р 52835-2007. Вина плодовые специальные и виноматериалы плодовые специальные. Общие технические условия. – Введ. 2007-12-27. –М.: Изд-во стандартов, 2007. – 6-7 с.
168. Ковалевский К.А., Ксенжук Н.И., Слезко Г.Ф. Технология и техника виноделия. –Киев: ИНКОС. –2004. –С. 559.
169. Бондакова М.В., Бутова С.Н., Солдатова С.Ю. Получение и использование экстракта красящих веществ винограда в косметических продуктах // Вестник НВГУ. –2015. –№ 1. – С. 56-62.

Приложение А

(обязательное)

Таблица А1 - Средние значения органолептических дескрипторов сладких фруктовых вин.

| Показатель | Описание | Якорные термины | Результаты оценки образцов сладких фруктовых вин (средние значения) | | | | | |
|----------------------------|---|--|---|----------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | | | Рябина (ВІ 7.7) | Рябина (контроль) | Слива (ВІ 7.4) | Слива (контроль) | Черная смородина (ВІ 7.4) | Черная смородина (контроль) |
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6</i> | <i>7</i> | <i>8</i> | <i>9</i> |
| <i>Внешний вид</i> | | | | | | | | |
| Характерный цвет плодов | Цвет, характерный для свежего фруктового сока (для рябины – насыщенный розовый, для черной смородины – темный фиолетовый, для сливы – светлый желтый) | Слабый: 0-1 Ярко выраженный: 8-10 | 8,8±0,7 | 8,9±0,7 | 9,5±0,5** | 8,6±0,6** | 9,7±0,4 | 9,8±0,4 |
| Прозрачность | Отсутствие опалесценции, возникающей при прохождении света через виноматериал | Значительная мутность: 0-2 Прозрачный с блеском: 9-10 | 9,5±0,7* | 9,0±0,7* | 9,1±0,4** | 7,3±0,6** | 9,0±0,4 ^{3*} | 8,4±0,7 ^{3*} |
| <i>Аромат</i> | | | | | | | | |
| Характерные фруктовые ноты | Аромат, характерный для свежих плодов | Слабый: 0-1 Ярко выраженный: 8-10 | 8,9±0,6 | 8,8±0,7 | 8,8±0,4** | 8,1±0,5** | 9±0,4 | 8,7±0,6 |
| Интенсивность аромата | Насыщенность и яркость осязаемого аромата в бокале | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 8,7±0,6 | 8,8±0,3 | 7,6±0,6 | 7,3±0,7 | 9,0±0,6 | 8,9±0,4 |
| Кислотность в аромате | Аромат, связанный с присутствием органических кислот в субстрате | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 5,3±0,4 | 5,2±0,4 | 4,2±0,5 | 4,0±0,5 | 5,1±0,6 | 4,9±0,5 |

Продолжение таблицы А1.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------------------------------|---|---|---------|---------|-----------|-----------|---------|---------|
| Гармоничность аромата | Общая слаженность и приятное впечатление от аромата | Низкая: 0-2 Высокая: 9-10 | 8,6±0,5 | 8,5±0,5 | 7,6±0,5** | 7,1±0,5** | 7,9±0,6 | 7,7±0,5 |
| Отсутствие посторонних нот | Отсутствие в аромате признаков порчи или посторонних нот | Заметное наличие: 0 Полное отсутствие: 10 | 9,0±0,5 | 9,0±0,6 | 8,8±0,5 | 8,5±0,4 | 9,0±0,7 | 8,8±0,5 |
| <i>Вкус и консистенция</i> | | | | | | | | |
| Характерный вкус свежих плодов | Вкус, характерный для свежих плодов | Слабый: 0-1 Сильный: 8-10 | 9,0±0,7 | 9,0±0,5 | 7,8±0,6 | 7,6±0,5 | 8,5±0,5 | 8,7±0,6 |
| Кислотность во вкусе | Вкус, связанный с присутствием органических кислот в субстрате | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 5,4±0,6 | 5,5±0,5 | 4,8±0,4 | 4,7±0,5 | 6,1±0,4 | 6,3±0,6 |
| Слаженность | Общие приятные вкусовые ощущения | Слабая: 0-3 Высокая: 8-10 | 8,7±0,6 | 8,6±0,6 | 8,8±0,5** | 7,4±0,5** | 8,4±0,5 | 8,5±0,6 |
| Отсутствие посторонних тонов | Отсутствие во вкусе первых признаков порчи, а также постороннего послевкуся | Наличие: 0-2 Полное отсутствие: 9-10 | 9,0±0,7 | 8,9±0,7 | 8,9±0,5 | 8,6±0,7 | 8,9±0,5 | 9,0±0,7 |
| Терпкость | Ощущение терпкости на языке, характерное для некоторых плодов и фруктов | Отсутствие: 0 Сильная: 10 | 7,3±0,6 | 7,5±0,6 | 3,6±0,5 | 3,2±0,4 | 5,3±0,7 | 5,5±0,5 |
| Консистенция | Восприятие разбавленности/насыщенности вина | Пустое: 0-4 Тельное: 7-10 | 7,8±0,7 | 8,1±0,6 | 7,7±0,6 | 7,4±0,4 | 9,3±0,5 | 9,3±0,6 |

*парные параметры вин из сортовой рябины (** из сливы, ^{3*} из черной смородины), *t*-критерии которых превышают порог значимости *t*(*P*,*f*).

Таблица А2 - Средние значения органолептических дескрипторов сухих вин.

| Показатель | Описание | Якорные термины | Результаты оценки образцов сухих фруктового и виноградных вин (средние значения) | | | | | |
|--------------------------------|--|--|---|----------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | | | Рябина (ВІ 7.7) | Рябина (контроль) | «Изабелла» (ВІ 7.7) | «Изабелла» (контроль) | «Ркацители» (ВІ 7.7) | «Ркацители» (контроль) |
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6</i> | <i>7</i> | <i>8</i> | <i>9</i> |
| <i>Внешний вид</i> | | | | | | | | |
| Характерный для субстрата цвет | Цвет, характерный для свежего сула (для рябины – насыщенный розовый; для сортов винограда: «Изабелла» –рубиновый, «Ркацители» – светлый желто-зеленый) | Слабый: 0-1 Ярко выраженный: 8-10 | 9,0±0,5 | 8,9±0,5 | 9,5±0,5 | 9,8±0,5 | 9,0±0,5 | 8,9±0,5 |
| Прозрачность | Отсутствие опалесценции, возникающей при прохождении света через виноматериал | Значительная мутность: 0-2 Прозрачный с блеском: 9-10 | 9,0±0,7* | 8,2±0,6* | 9,5±0,6 | 9,2±0,5 | 8,7±0,5 ^{3*} | 7,1±0,3 ^{3*} |
| <i>Аромат</i> | | | | | | | | |
| Сортовой (фруктовый) аромат | Аромат, характерный для используемого сорта винограда (вида плодов/ягод) | Слабый: 0-1 Ярко выраженный: 8-10 | 8,8±0,5 | 8,71±0,5 | 9,5±0,5** | 9,0±0,5** | 8,2±0,4 ^{3*} | 7,4±0,4 ^{3*} |
| Интенсивность аромата | Насыщенность и яркость осязаемого аромата в бокале | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 7,4±0,4 | 7,0±0,4 | 7,7±0,5 | 7,83±0,5 | 5,4±0,3 | 5,5±0,5 |
| Кислотность в аромате | Аромат, связанный с присутствием органических кислот в субстрате | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 6,1±0,3* | 5,6±0,4* | 5,8±0,5 | 6,2±0,5 | 5,1±0,3 ^{3*} | 4,3±0,6 ^{3*} |
| Гармоничность аромата | Общая слаженность и приятное впечатление от аромата | Низкая: 0-2 Высокая: 9-10 | 8,6±0,5 | 8,2±0,5 | 8,4±0,4** | 7,8±0,4** | 8,3±0,5 ^{3*} | 7,8±0,4 ^{3*} |

Продолжение таблицы А2.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------------------------|---|--|---------|----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|
| Отсутствие посторонних нот | Отсутствие в аромате признаков порчи или посторонних нот | Заметное наличие: 0 Полное отсутствие: 10 | 9,3±0,7 | 9,2±0,65 | 9,1±0,5 | 9±0,5 | 9,1±0,5 | 8,9±0,4 |
| <i>Вкус и консистенция</i> | | | | | | | | |
| Вкус свежих ягод | Вкус, характерный для свежих ягод | Слабый: 0-1 Сильный: 8-10 | 9,5±0,6 | 9,3±0,6 | 8,8±0,5 | 8,7±0,61 | 7,8±0,5 ^{3*} | 6,9±0,3 ^{3*} |
| Кислотность во вкусе | Вкус, связанный с присутствием органических кислот в субстрате | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 6,8±0,5 | 6,7±0,4 | 9,1±0,4 | 8,8±0,4 | 5,5±0,3 | 5,6±0,5 |
| Слаженность | Общие приятные вкусовые ощущения | Слабая: 0-3 Высокая: 8-10 | 8,5±0,5 | 8,1±0,4 | 8,4±0,4** | 7,6±0,3** | 8,1±0,4 | 7,8±0,5 |
| Отсутствие посторонних тонов | Отсутствие во вкусе первых признаков порчи, а также постороннего послевкуся | Наличие: 0-2 Полное отсутствие: 9-10 | 9,8±0,4 | 9,1±0,5 | 8,9±0,5 | 9,0±0,5 | 9,4±0,5 | 9,1±0,5 |
| Терпкость | Ощущение терпкости на языке, характерное для некоторых плодов и фруктов | Отсутствие: 0 Сильная: 10 | 6,2±0,4 | 6,4±0,5 | 4,5±0,4 | 4,3±0,46 | 3,2±0,4 | 3,1±0,4 |
| Консистенция | Восприятие разбавленности/насыщенности вина | Пустое: 0-4 Тельное: 7-10 | 8,8±0,5 | 8,6±0,6 | 8,3±0,3 | 8,1±0,5 | 7,1±0,4 | 6,9±0,6 |

*парные параметры вин из сортовой рябины (** из винограда «Изабелла», ^{3*} из винограда «Ркацители»), *t*-критерии которых превышают порог значимости *t*(*P*,*f*).

Таблица А3 - Средние значения органолептических дескрипторов полусухого и полусладкого виноградных вин.

| Показатель | Описание | Якорные термины | Результаты оценки образцов полусухого и полусладкого виноградных вин (средние значения) | | | |
|--------------------------------|---|--|---|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | | | «Цимлянский Черный» (ВІ 7.7) | «Цимлянский Черный» (контроль) | «Каберне Совиньон» (ВІ 7.7) | «Каберне Совиньон» (контроль) |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>Внешний вид</i> | | | | | | |
| Характерный для субстрата цвет | Цвет, характерный для свежего сула (для сортов винограда: «Цимлянский Черный» –глубокий красный, «Каберне Совиньон» – насыщенный рубиновый) | Слабый: 0-1 Ярко выраженный: 8-10 | 9,5±0,5 | 9,4±0,6 | 8,4±0,4** | 7,8±0,4** |
| Прозрачность | Отсутствие опалесценции, возникающей при прохождении света через виноматериал | Значительная мутность: 0-2 Прозрачный с блеском: 9-10 | 9,0±0,6* | 8,5±0,5* | 8,9±0,4 | 8,7±0,5 |
| <i>Аромат</i> | | | | | | |
| Сортовой аромат | Аромат, характерный для используемого сорта винограда | Слабый: 0-1 Ярко выраженный: 8-10 | 8,9±0,5 | 9,0±0,4 | 9,1±0,6 | 8,9±0,5 |
| Интенсивность аромата | Насыщенность и яркость осязаемого аромата в бокале | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 9,1±0,5 | 8,9±0,4 | 8,5±0,4 | 8,4±0,5 |
| Кислотность в аромате | Аромат, связанный с присутствием органических кислот в субстрате | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 6,3±0,5 | 6,1±0,5 | 4,2±0,4 | 4,1±0,4 |
| Гармоничность аромата | Общая слаженность и приятное впечатление от аромата | Низкая: 0-2 Высокая: 9-10 | 8,8±0,5 | 8,7±0,6 | 8,3±0,4 | 7,9±0,4 |
| Отсутствие посторонних нот | Отсутствие в аромате признаков порчи или посторонних нот | Заметное наличие: 0 Полное отсутствие: 10 | 9±0,5 | 9±0,5 | 8,7±0,4 | 8,7±0,6 |
| <i>Вкус и консистенция</i> | | | | | | |

Продолжение таблицы А3.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------------------------|---|---|---------|---------|-----------|-----------|
| Вкус свежих ягод | Вкус, характерный для свежих ягод | Слабый: 0-1 Сильный: 8-10 | 8,6±0,6 | 8,5±0,5 | 7,4±0,5 | 7,0±0,5 |
| Кислотность во вкусе | Вкус, связанный с присутствием органических кислот в субстрате | Слабая: 0-3 Сильная: 8-10 | 5,5±0,4 | 5,4±0,4 | 4,2±0,5** | 3,6±0,4** |
| Слаженность | Общие приятные вкусовые ощущения | Слабая: 0-3 Высокая: 8-10 | 8,9±0,5 | 8,5±0,5 | 8,3±0,4 | 8±0,4 |
| Отсутствие посторонних тонов | Отсутствие во вкусе первых признаков порчи, а также постороннего послевкуся | Наличие: 0-2 Полное отсутствие: 9-10 | 9,0±0,5 | 9,1±0,5 | 9,0±0,4 | 8,7±0,6 |
| Терпкость | Ощущение терпкости на языке, характерное для некоторых плодов и фруктов | Отсутствие: 0 Сильная: 10 | 5,6±0,5 | 5,3±0,5 | 2,5±0,3 | 2,7±0,5 |
| Консистенция | Восприятие разбавленности/насыщенности вина | Пустое: 0-4 Тельное: 7-10 | 9,3±0,4 | 9±0,6 | 8,5±0,5 | 8,2±0,5 |

*парные параметры вин из сорта винограда «Цимлянский Черный» (** из винограда «Каберне Совиньон»), *t*-критерии которых превышают порог значимости *t*(*P*,*f*).