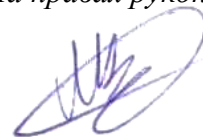


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» (ФГБОУ ВО «КГТУ»)

На правах рукописи



САМСОНОВ МАКСИМ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СНЕКОВ ИЗ СЫРЬЯ ВОДНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ОСНОВЕ АСТАКСАНТИНОСОДЕРЖАЩЕГО
БЕЛКОВОГО ГИДРОЛИЗАТА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПАНЦИРНЫХ
ОТХОДОВ КРЕВЕТКИ**

05.18.04 «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных
производств»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:
кандидат технических наук,
Винокур М.Л.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Панцирьсодержащие отходы как перспективное сырье для получения пищевого белкового гидролизата	9
1.2 Способы получения белковых гидролизатов из панцирьсодержащих отходов ракообразных	12
1.3 Обоснование выбора фермента для гидролиза панцирьсодержащих отходов.....	21
1.3.1 Общая характеристика протеолитических ферментов	21
1.3.2 Влияние температуры на скорость протеолитической реакции	23
1.3.3 Влияние водородного показателя на скорость протеолитических реакций.....	24
1.3.4 Влияние гидромодуля на ферментативный гидролиз.....	25
1.3.5 Кинетика ферментативного гидролиза.....	26
1.3.6 Ферменты, используемые для гидролиза панцирьсодержащих отходов.....	27
1.3.7 Используемое сырье для выделения микробиологических ферментов	29
1.3.8 Характеристика фермента протосубтилина ГЗх	34
1.4 Способы осаждения и обезвоживания компонентов, выделяемых при ферментативной обработке панцирьсодержащих отходов.....	37
1.5 Механизмы формирования эмульгированной систем в декантированном гидролизате.....	42
1.6 Биохимические особенности астаксантина в составе белкового гидролизата.....	48
1.7 Практические аспекты применения белкового гидролизата в производстве пищевых продуктов	54
Заключение по обзору литературы	58
2 ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	59
2.1 Методика постановки эксперимента	59
2.2 Характеристика исследуемого сырья	60
2.3 Методы физико-химических исследований.....	61
2.4 Методика органолептических исследований.....	65
2.5 Определение микробиологических показателей и токсичных элементов.....	66
2.6 Определение потенциальной биологической ценности белка.....	66
2.7 Оценка экономической эффективности технологии комбинированных снеков	67
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	68
3.1 Исследование эффективности извлечения белка и липидов из панцирного субстрата с использованием трипсина, химотрипсина и протосубтилина ГЗх	68

3.2 Исследование влияния процессов предварительной обработки на гидролиз панцирного субстрата протосубтилином ГЗх.....	73
3.2.1 Влияние предварительного гидромеханического удаления части мягкого эпителия на интенсивность депротеинизации панцирного субстрата и степень гидролиза белка	74
3.2.2 Влияние механической обработки панцирного субстрата на интенсивность ферментативного гидролиза.....	77
3.3 Обоснование технологии белковых гидролизатов для создания комбинированных снеков.....	83
3.3.1 Обоснование параметров гидролиза с учетом накопления аминогрупп и липидов в жидкой декантированной фракции гидролизата.....	83
3.3.2 Определение продолжительности вакуумной сушки плотной фракции и режимов инактивации протосубтилина ГЗх	93
3.3.3 Технология пищевого белкового гидролизата	96
3.4 Обоснование технологии комбинированных снеков.....	106
3.4.1 Подбор рационального соотношения компонентов рецептуры снеков.....	107
3.4.2 Технология комбинированных снеков	112
3.4.3 Производственная апробация разработанной технологии снеков	123
3.4.4 Расчет экономической эффективности технологии комбинированных снеков.....	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	127
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	128
ПРИЛОЖЕНИЕ А ТУ 10.20.31–296–00472093–2018.....	147
ПРИЛОЖЕНИЕ Б ТИ 10.20.31–296–00472093–2018.....	148
ПРИЛОЖЕНИЕ В ТУ 10.89.14–295–00472093–2018.....	149
ПРИЛОЖЕНИЕ Г ТИ 10.89.14–295–00472093–2018.....	150
ПРИЛОЖЕНИЕ Д ТУ 10.85.12–007–00471544–2018.....	151
ПРИЛОЖЕНИЕ Е ТИ 10.85.12–007–00471544–2018.....	152
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж Патент RU № 2690470.....	153
ПРИЛОЖЕНИЕ К Бланк органолептической оценки снеков	155
ПРИЛОЖЕНИЕ Л Дескрипторы для органолептической оценки снеков.....	157
ПРИЛОЖЕНИЕ М Экономическая эффективность технологии снеков.....	159
ПРИЛОЖЕНИЕ Н Протоколы исследований	163
ПРИЛОЖЕНИЕ П Акт производственных испытаний.....	168

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Стратегия развития рыбохозяйственного комплекса Российской Федерации от 26 ноября 2019 г. на период до 2030 г. подразумевает внедрение новых технологических решений, позволяющих расширить ассортимент выпускаемых продуктов, содержащих необходимые для организма незаменимые аминокислоты, каротиноиды (астаксантин), минеральные вещества, а также полиненасыщенные жирные кислоты [12, 38, 39].

Возможное решение поставленной задачи может быть связано с включением в рецептуру пищевого продукта белкового гидролизата, выделенного посредством частичного ферментолиза панцирьсодержащих отходов (ПСО). В вырабатываемых ПСО содержатся около 45 % белка в пересчете на сухое вещество, а также биологически активные липидокаротиноидные комплексы (ЛКК), в том числе астаксантин, которые способны соэкстрагироваться при ферментативной обработке вместе с белками [14, 31, 36, 46, 55]. Получение белковых гидролизатов является приоритетным направлением переработки ПСО, так как позволяет извлечь ценные компоненты и расширить ассортимент выпускаемой пищевой продукции [14, 60].

В настоящее время ПСО используется в основном для производства панцирной муки, хитина и хитозана, липидокаротиноидных экстрактов, а также кормовых белковых гидролизатов. При этом получение пищевых белковых гидролизатов с низким содержанием жира является приоритетным направлением комплексной переработки ПСО, так как это позволит расширить ассортимент выпускаемой продукции [38, 43, 138].

Одним из рациональных способов применения таких гидролизатов в технологии пищевых изделий является создание комбинированных рыборастительных продуктов, основным принципом сохранения биологически ценных компонентов которого является ксеробиоз посредством вакуумного высушивания. Получаемые таким образом изделия являются концентратами нутриентов и относятся к снековой продукции [94, 96, 102, 103].

Снеки являются быстрорастущим сегментом пищевой индустрии, что объясняется высокой концентрацией необходимых для организма веществ (например, астаксантина), способных удовлетворять до 30–40 % от суточной потребности организма в них. При ежедневном потреблении снеков, содержащих от 1 до 2 мг астаксантина, улучшается работа сердечно-сосудистой, мочеполовой и иммунной систем организма, а также снижается избыточное кровяное давление [148, 149].

Современные тенденции производства комбинированных снеков также ориентированы на создание привлекательной вкусоароматической композиции, что

достигается за счет включения в рецептуру растительных компонентов и, в частности, некоторых бобовых культур (зеленой чечевицы, красной и белой фасолей). Подобное решение позволяет дополнительно обогатить конечный продукт незаменимыми аминокислотами, а также сложными углеводами.

В производстве комбинированных рыборастворительных снеков на основе астаксантиносодержащего белкового гидролизата и бобовых культур главной задачей является сохранение биологически ценных веществ (астаксантин) на всех технологических этапах. Однако существующие технологии рыборастворительных снеков, включающие белковые гидролизаты, не обеспечивают конечный продукт необходимым содержанием астаксантина.

Степень разработанности темы. Научные основы выделения пищевых белковых гидролизатов из отходов переработки водных биологических ресурсов (ВБР) описываются в многочисленных научных статьях и монографиях как отечественных, так и зарубежных ученых. Ведущие принципы описаны в работах М.П. Андреева, Л.В. Антиповой, В.М. Быковой, В.А. Варламова, Ю.М. Гафурова, В.И. Еремцева, Г.М. Кима, Т.Н. Слуцкой, С.Н. Максимовой, О.Я. Мезеновой, С.В. Немцева, К.Г. Скрыбина, Б.К. Симпсона, Н.Д. Равлингса, М.Е. Цибизовой, А. П. Черногорцева и др. Применение рыбных гидролизатов в составе основного компонента рецептуры пищевых продуктов рекомендовали Л.В. Антипова, В. Д. Богданов, А. Веинберг, В.Н. Голубев, Н. Кавано, О.Я. Мезенова, Л.Г. Ипатова, Л. Роуссел, Л.Я. Телишевская и др.

Тем не менее, проблемы выделения из ПСО обезвоженного пищевого гидролизата и его дальнейшего применения в технологии производства астаксантиносодержащих рыборастворительных снеков, обладающих приемлемой вкусоароматической композицией, до конца не изучены.

Цель и задачи работы. Целью диссертационной работы являлось повышение эффективности использования панцирьсодержащих отходов варено-мороженой креветки путем их ферментативного гидролиза и получения снеков на основе обезвоженного белкового гидролизата.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи.

1. Исследовать химический состав гидролизатов ПСО, выделенных с использованием протосубтилина ГЗх и сериновых протеиназ животного происхождения.
2. Изучить возможное влияние на гидролиз ПСО предварительного гидромеханического удаления мягкого эпителия панциря и процесса его измельчения.
3. Обосновать дозировку фермента и продолжительность гидролиза ПСО с точки зрения выхода целевых компонентов.

4. Предложить технологию пищевого белкового гидролизата из панцирьсодержащих отходов вареной северной креветки.

5. Определить рациональное соотношение компонентов рецептуры комбинированных снеков с учетом их органолептических характеристик.

6. Разработать технологию комбинированных снеков с использованием обезвоженного белкового гидролизата и растительного сырья бобовой группы – зеленой чечевицы, красной и белой фасолей.

7. Изучить химический состав, показатели безопасности комбинированных снеков, а также установить сроки их годности.

8. Разработать соответствующую техническую документацию.

Научная новизна работы. Научно обоснована и экспериментально подтверждена целесообразность использования трехступенчатого гидролиза в технологии переработки ПСО северной креветки, что позволяет извлекать до 86 % протеина, 97 % астаксантина и 94 % липидов от их общего содержания в панцирном сырье.

Изучена степень извлечения органических компонентов на различных этапах технологического процесса переработки ПСО: при гидромеханической обработке извлекается до 25,8 % протеина, 53,1 % липидов и 35,6 % астаксантина; на первой ступени гидролиза извлекается до 34,9 % протеина, 25,5 % липидов и 31,7 % астаксантина; на второй ступени гидролиза до 24,8 % протеина, 15,6 % липидов и 29,8 % астаксантина от общего содержания в ПСО.

Исследованы показатели качества белкового гидролизата, полученного посредством трехступенчатого гидролиза ПСО – содержание астаксантина 9,6 мг/100 г и белка 80,9 г/100 г, биологическая ценность белка 67,3 %, а также установлена продолжительность хранения. Определены показатели химической и микробиологической безопасности белкового гидролизата, выделенного из ПСО вареной северной креветки.

Научная новизна подтверждена патентом RU № 2690470 «Способ производства рыбо-растительных крипсов» (в соавторстве с М.Л. Винокуром).

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана технология получения пищевого астаксантиносодержащего белкового гидролизата из ПСО с использованием фермента протосубтилина ГЗх и комбинированных снеков, произведенных на основе обезвоженного астаксантиносодержащего белкового гидролизата и растительных компонентов бобовой группы. Установлена возможность получения гармоничного профиля вкуса снеков при использовании гидролизата за счет применения бобовых культур в качестве основных компонентов. Изучены показатели

качества комбинированных снеков – аминокислотные и химические составы, показатели микробиологической безопасности, а также проведена их органолептическая оценка.

На основе полученных экспериментальных данных разработан комплект технической документации (технические условия (ТУ) 10.89.14-295-00472093-2018 «Каротинопротеиновый концентрат», ТУ 10.20.31-296-00472093-2018 «Продукт от разделки варено-мороженных креветок», ТУ10.85.12007-00471544-2018 «Белково-растительные крипсы» и соответствующие технологические инструкции). Разработанная технология снеков апробирована в производственных условиях ИП «Шалаев В.С.» (Калининградская обл., п. Озерки). Показана экономическая эффективность внедрения новых разработок в производство.

Методология и методы исследований базируются на комплексном подходе к постановке эксперимента при использовании общенаучных и специальных методов, упоминаемых в современных научных публикациях, посвященных данной тематике.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Способ получения пищевого астаксантиносодержащего белкового гидролизата из ПСО с использованием предварительного гидромеханического удаления части белков и липидов, частичного протеолиза препаратом, относящимся к классу микробных протеиназ, с последующим осаждением белковой массы и вакуумной сушкой;
- 2) Показатели качества и сроки годности пищевого белкового гидролизата;
- 3) Рациональное соотношение белкового гидролизата и растительных компонентов семейства бобовых в рецептуре снеков;
- 4) Показатели качества и сроки годности комбинированных снеков.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследования подтверждена не менее трехкратной повторяемостью опытов с применением стандартных и общепринятых химических, микробиологических, физических методов анализа, а также проведением исследований в специализированных лабораториях на современном оборудовании. Статистическая обработка данных проводилась стандартными методами оценки результатов испытаний с помощью программы Microsoft Excel 2012.

Основные положения диссертационной работы представлены в форме докладов на трех международных и одной всероссийской научных конференциях, а именно на: Международной научной конференции IV Международного Балтийского форума «Инновации в технологии продуктов здорового питания» 2016 г.; V Международной научно-практической конференции IV Международного Балтийского форума «Пищевая и морская биотехнология» 2016 г.; I Всероссийской научно-технической конференции

студентов, аспирантов и молодых ученых, «Дальрыбвтуз» 2016 г.; Международной научной конференции V Международного Балтийского форума «Инновации в технологии получения здорового питания» 2017 г.; Международной научной конференции VI Международного Балтийского форума «Инновации в технологии продуктов здорового питания» 2018 г.

Личный вклад соискателя в проведение исследования в 2015–2019 гг. состоял в формировании цели и задач, разработке технологической схемы исследований, участии в экспериментах, анализе и интерпретации полученных результатов. На защиту вынесены только те положения и результаты научно-практической деятельности, в формировании которых роль соискателя была определяющей.

Научные публикации по теме работы. По материалам научного эксперимента опубликовано 13 статей и тезисов, из них 4 статьи – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации, а также получен 1 патент.

Объем и структура диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов и их обсуждения, заключения, списка использованных источников, насчитывающего 232 наименования, в том числе 122 зарубежных авторов, и 12 приложений. Диссертационная работа изложена на 169 страницах. Результаты исследования отображены в 45 иллюстрациях и графических рисунках и 34 таблицах.

Благодарности. Соискатель выражает признательность за неоценимую помощь в работе над диссертацией научному руководителю к.т.н., доценту кафедры технологии продуктов питания ФГБОУ ВО «КГТУ» Винокуру Михаилу Леонидовичу.

Благодарен за помощь в проведении исследований сотрудникам Атлантического филиала ФГБНУ «ВНИРО» («АтлантНИРО») и лично д.т.н., профессору Андрееву Михаилу Павловичу.

Признателен всем преподавателям кафедры технологии продуктов питания ФГБОУ ВО «КГТУ», а особенно к.т.н., доценту, заведующей кафедрой Инне Марковне Титовой.

Особую благодарность выражаю заведующей кафедрой пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «КГТУ», д.т.н., профессору О.Я. Мезеновой за ценные советы, консультации и поддержку на основных этапах выполнения диссертации.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Панцирьсодержащие отходы как перспективное сырье для получения пищевого белкового гидролизата

Целью развития рыбохозяйственного комплекса России является обеспечение существующих производств передовыми технологиями, отвечающими современным тенденциям. Одним из возможных направлений такого развития может стать разработка и применение технологий производства пищевых продуктов из гидробионтов на основе нетрадиционного сырья. Подобное решение позволит использовать данный продукт в качестве средств профилактики некоторых заболеваний [72], в первую очередь – сердечно-сосудистой системы и злокачественных образований [84, 98]. Продукты, произведенные из отходов переработки водных биологических ресурсов (ВБР), могут являться концентратами важных пищевых компонентов [8, 80], так как предлагаемое сырье содержит полноценные белки, липиды, витамины астаксантин, хитин, а также минеральные вещества и коллаген [53, 59, 96]. В зависимости от способов обработки отходов, полученных в результате переработки ВБР, в том числе и ракообразных, выделяемые вещества в продукте могут иметь различные массовые соотношения. Возможное комбинирование или модификация способов воздействий на начальный субстрат (ПСО) позволяет менять соотношение компонентов в химическом составе, тем самым достигая нужных биологических эффектов в конечном продукте [14, 21, 31, 35, 47, 62]. Применение извлеченных компонентов с заданными свойствами (например, с желаемой концентрацией белка, липидов, астаксантина, минеральных веществ) позволяет расширить ассортимент выпускаемой продукции, как в кормовом, так и в пищевом или медицинском производстве [12, 55].

Одним из перспективных видов сырья для получения вышеперечисленных компонентов являются ПСО вареной северной креветки (*Pandalus borealis*) [41]. Подобная заинтересованность объясняется растущим объемом промысла креветки, ростом производства вареной продукции из данного гидробионта, а также высокой биологической ценностью составных компонентов сырья (ПСО) – наличием в них протеиновых и липидных комплексов с содержанием каротиноидов (астаксантина) и минеральных веществ [80, 84, 98].

Однако современные пищевые производства используют остаточные панцирные отходы для получения хитозана, панцирной муки, а также «жирных» белковых гидролизатов, предназначенных, прежде всего, для кормовых целей. В некоторых случаях

ПСО используют для получения липидокаротиноидных комплексов посредством сверхкритической CO₂ экстракции [93, 98]. Подобное недооцененное использование ПСО в кормовых целях объясняется высокой концентрацией липидов в конечном продукте, а также с затратами на обезвоживание сильно гидролизованных ферментоллизатов.

Панцирная система ракообразных имеет многоуровневое капиллярно-пористое основание антропоидного типа, называемое кутикулой (рисунок 1.1), основными функциями которой являются структурно-механическая и защитная. Экранирующая функция кутикулы заключается в противодействии попаданию в организм ракообразных нежелательных веществ и микроорганизмов. При обычных условиях проницаемость для большинства жидких растворов (в том числе и ферментных) невозможна. Подобное свойство объясняется, прежде всего, особым композитным и многоуровневым строением панциря, что придает ему дополнительную стойкость. В состав кутикулы входит верхний слой (эпикутикула, экзокутикула), цементный и базальтовый слой, пигментный слой, эндокутикула, клеточный (гиподермальный) слой и поровые каналы [14, 56, 92, 93].

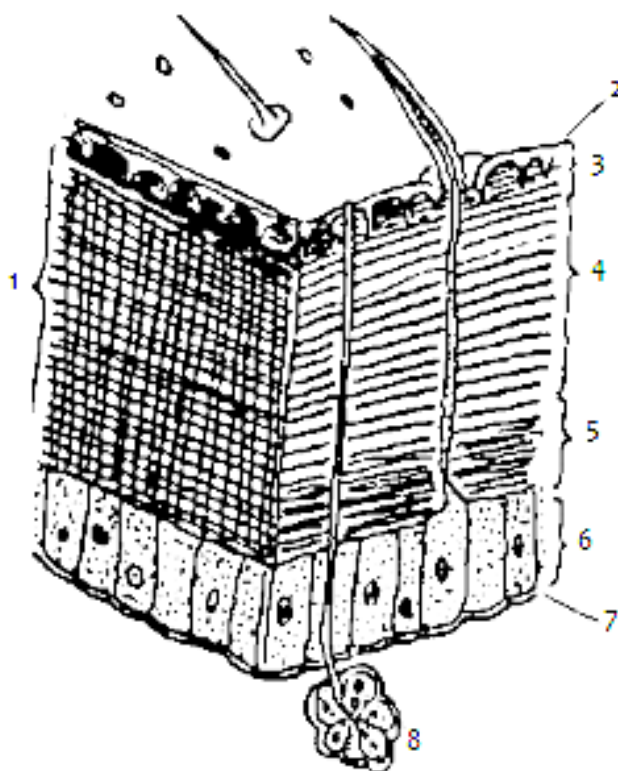


Рисунок 1.1 – Устройство панциря ракообразных

- 1 – эндокутикула, 2 – эпикутикула, 3 – пигментный слой, 4 – слой кальция, 5 – некальцинированный слой, 6 – гиподерма и эпидерма, 7 – базальная мембрана; 8 – вертикальный поровый канал с разветвленными мембранами хроматофор

Эпикутикула состоит из поверхностной мембраны, непроницаемого для жидких сред цементного (базального) слоя и наростов в виде шипов или микротрихий. Цементный слой состоит из плохо проницаемых кристаллических решеток. Подобное строение не позволяет эффективно использовать ферментные растворы при гидролизе ПСО [56, 92, 93, 185].

Экзокутикулярный слой представлен в виде плотноупакованных хитино-минеральных пластин с проходящими через них горизонтальными кристаллоаморфными фибриллами. Такое композитное строение препятствует диффундированию жидкостей и их дальнейшему проникновению в другие слои панциря [185].

Пигментный слой состоит из каротиноидов (астаксантина) как в аморфной форме, так и в связи с липидными и протеиновыми (частично в составе разветвленных мембран хроматофор) комплексами [185].

В состав эндокутикулы (внутренний слой кутикулы) входят хитино-минеральные пластины с проходящими через них фибриллами с поперечным сечением $\approx 3-4 \times 10^{-7}$ см, упакованные в минеральные кристаллические трубки. Пласт с подобным многоуровневым строением обладает низкой степенью проницаемости для жидких систем при обычных условиях, что может снизить эффективность извлечения белков и астаксантина из ПСО [118, 146].

Гиподерма и эпидерма (клеточный слой) состоят преимущественно из белковых соединений и небольшого количества каротиноидов, находящихся в аморфном или связанном состоянии (в составе каротинопротеинового комплекса мембран хроматофор). Базальная мембрана (завершающий слой кутикулы) состоит из непроницаемой минеральной кристаллической решетки [218].

Отдельно можно выделить поровые (пористые) каналы, проходящие через все слои кутикулы, диаметром $\approx 0,012$ мкм ($1,2 \times 10^{-5}$ см). Пористые каналы состоят из длинных фибрилл с жидкокристаллическим окружением и микроотверстиями на уровне пигментного и гиподермального слоя [185, 218]. Внутреннее пространство поровых каналов частично заполнено сильноразветвленными мембранами хроматофор. Возможное технологическое значение каналов может заключаться в распространении жидкостных растворов (в том числе ферментных) до труднодоступных слоев кутикулы, что обеспечит необходимую степень извлечения каротинопротеинов и каротиноидов из внутренних слоев ПСО.

Специфичность структуризации и строения капиллярно-пористой системы ПСО способствует концентрации и сохранению астаксантина в начальной форме даже при кратковременной тепловой обработке. Однако структурно-механические свойства

композитов кутикулы ухудшают массообменные и диффузионные процессы в зависимости от уровня распространения фермента [56, 64, 92, 93, 185].

При распространении жидкости (в том числе ферментных растворов) по слоям панциря необходимо учитывать радиус образующихся каналов. При достижении радиуса менее $\approx 1 \times 10^{-5}$ см происходит снижение влияния гидравлических сил (закона о капиллярных явлениях) до минимума и пропорционально возрастает влияние диффузионных и осмотических законов [129, 196, 214, 229, 222]. Сужение поперечного сечения частично гидролизованных фибрилл до значения ниже $3,2 \times 10^{-8}$ см не способствует дальнейшему распространению ферментных растворов при обычных условиях. Достижение распределяемой жидкостью точки соприкосновения с кристаллическими мембранами способствует уравниванию осмотических значений и последующему прекращению перемещения раствора по капиллярам. Следовательно, только «поверхностно расположенные» фибриллы кутикулы подвержены гидролизу, а дальнейшее проникновение фермента к внутренним слоям минимально, что в свою очередь не способствует повышению выхода каротиноидов и каротинопротеинов имеющимися технологиями без использования дополнительных деминерализаторов или специфичных ферментных препаратов [92, 93, 185, 196, 214, 229, 222].

Технологическое решение проблемы эффективного гидролиза ПСО одной протеазой (или одним комплексом протеаз) может быть связано с разработкой и применением научно обоснованных режимов получения пищевого белкового гидролизата, состоящего из протеина, астаксантина и истинных каротинопротеинов (в меньшей степени). Другое решение проблемы распределения растворов протеазы по слоям кутикулы заключается в возможном использовании транспортных свойств поровых каналов. Частичное распространение ферментного раствора по слоям кутикулы также возможно по микрокапиллярам, образовавшихся в результате неполного гидролиза белковых составляющих плотноупакованных фибрилл и по кутикулярным разрывам, образовавшихся в результате механического воздействия (измельчение).

1.2 Способы получения белковых гидролизатов из панцирьсодержащих отходов ракообразных

Пищевые белковые гидролизаты, извлекаемые из малоценного, некондиционного рыбного сырья, панцирных отходов, а также из нетрадиционных видов гидробионтов и отходов их переработки, могут являться источником ценных компонентов, в том числе содержащих астаксантин. Успешная реализация новых перерабатывающих технологий на

производстве стала возможным благодаря использованию прикладных знаний и внедрению инновационных методов. Сегодня существует большое количество научно обоснованных и подтвержденных патентами технологий, целью которых является выделение максимального количества пищевых компонентов из водного сырья (в том числе и из панцирных отходов ракообразных) при производстве белковой продукции, как для кормовых, так и для пищевых целей [14, 56, 64, 203].

Однако комплексная переработка различных панцирных отходов гидробионтов для получения ценных пищевых компонентов является общепризнанной проблемой [154]. Изучение способов решения данной проблемы ведется достаточно давно и направлено на получение белковых гидролизатов, которые в дальнейшем будут использоваться в качестве пищевых биологически активных добавок или в качестве самостоятельного продукта или основного ингредиента [42, 55, 62, 109].

Белковые массы (гидролизаты), полученные при гидролизе ПСО, используются в основном как составляющая кормов [12, 47, 59] и в меньшей степени как пищевой ингредиент в продуктах питания [155, 188]. При этом существующие и запатентованные технологии производства пищевых продуктов уже включают в себя белковые массы, полученные при гидролизе водного сырья в качестве основного ингредиента или пищевого наполнителя [50].

Сегодня разработка комплексных малоотходных технологий выделения пищевых компонентов из панцирных отходов промысловых ракообразных является перспективным направлением развития или модернизации рыбоперерабатывающего комплекса России. Подобная заинтересованность в использовании научно обоснованных ресурсосберегающих технологий переработки ПСО необходима для обеспечения населения необходимыми продуктами, где одним из возможных способов получения пищевых компонентов является гидролиз ПСО [64, 53, 56, 68, 93].

Гидролиз – это расщепление азотсодержащих молекул белка с разрушением связи типа азот / углерод с последующим изменением первичного состояния (структуры) (рисунок 1.2). Использование гидролиза позволяет выделять белковые гидролизаты, в том числе и пищевые [53, 66, 68]. В опубликованных работах в значительной степени описаны закономерности и характеры кинетических значений при гидролизе белково-минеральных субстратов (ПСО), разработаны математические модели гидролиза и выявлены физико-химические показатели конечного и начального сырья для их применения в пищевой промышленности [9, 95]. Особый интерес представляют работы ряда отечественных и зарубежных ученых, исследующих кинетические зависимости при гидролизе белково-

минерального субстрата и получение белковых гидролизатов для пищевого назначения [58, 59, 154].

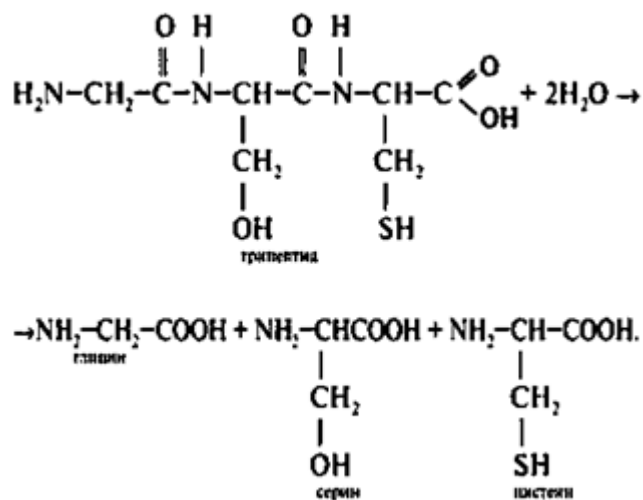


Рисунок 1.2 – Гидролиз трипептида

Процесс гидролиза белково-минерального субстрата может также осуществляться под действием различных катализаторов (рисунок 1.3), в качестве которых могут использоваться органические и неорганические растворители, ферменты (ферментативный гидролиз) или физические катализаторы (температура, давление, механическое воздействие) [53, 110].

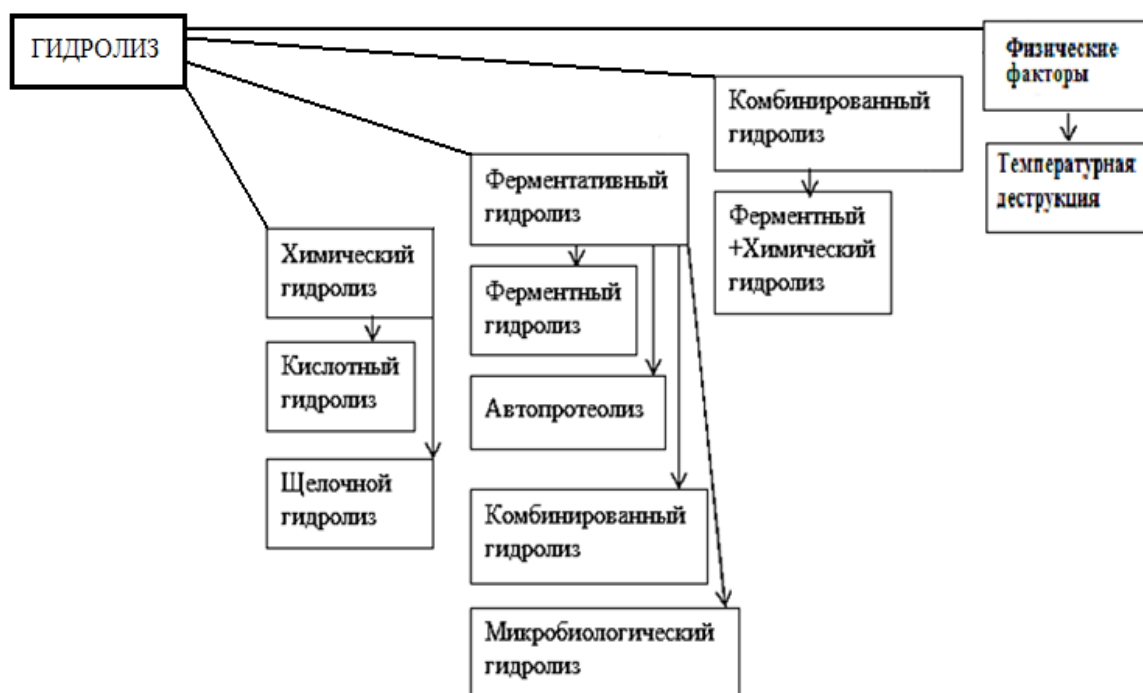


Рисунок 1.3 – Основные способы гидролиза белково-минерального субстрата

Физическая (тепловая) деструкция белково-минерального субстрата основана на разрыве связей протеина с хитино-минеральным матриксом за счет использования температурного фактора или при воздействии механических сил. Способ физико-механического извлечения пищевых компонентов является технологически простым, относительно непродолжительным и позволяет значительно снизить микробиологическую обсемененность готового продукта. К недостаткам можно отнести более низкий выход и качество получаемого продукта [35, 67].

Способ химического гидролиза сырья в большей степени основан на кислотном разрыве белковых связей, где в качестве катализаторов используют соляную или серную кислоты. Продолжительность такого процесса в зависимости от начального состояния сырья и температуры проведения гидролиза может варьироваться от нескольких часов до суток [34, 220]. Воздействие кислотного катализатора позволяет достигать глубокой степени гидролиза. Также это позволяет исключить микробиологическую загрязненность белкового гидролизата. Однако такой способ гидролиза способствует увеличению азотсодержащих веществ с низким молекулярным значением (аминокислоты), а также аммиака при разрушении аминокислот, что в свою очередь может снизить биологическую ценность конечного продукта и усложнит последующее концентрирование сухих веществ [26].

При глубоком химическом гидролизе распаду подвергаются такие значимые аминокислоты как триптофан, серин, цистеин, треонин и многие витамины. Отщепление аминокислот происходит у аспарагина и глутамина [94]. Продукты глубокого кислотного гидролиза окрашиваются в темный или коричневый цвет в результате глубокого распада молекул белка, каротиноидов (астаксантина) и липидов, с образованием гуминовых соединений [96]. Удаление нежелательного окраса и побочных соединений происходит за счет использования дополнительных адсорбентов (например, активированного угля), однако при таком способе часть низкомолекулярных пептидов и аминокислот (в частности, цистин) адсорбируется на поверхности агента и удаляется вместе с гуминовыми веществами. Последующая нейтрализация катализаторов может образовывать в гидролизатах токсичные для организма соединения (хлориды и сульфаты) [53, 96]. Для снижения негативных влияний на белковый субстрат связанных с расщеплением лабильных соединений при использовании кислотных катализаторов отечественные ученые предлагают проводить химический гидролиз в регулируемой газовой среде с использованием инертных газов или с добавлением органических растворителей [53].

Гидролиз с использованием щелочи применяют нечасто, так как происходит значительное разрушение основных низкомолекулярных соединений (лизин, цистин, цистеин, аргинин), а также трансформации Альфа-аминокислот в Д-аминокислоты с последующим образованием лизино-аланина и лантионина, которые являются токсичными соединениями [12].

Химический способ гидролиза субстрата обладает высокой степенью коррозии для оборудования и инвентаря, что увеличивает затраты, связанные с очисткой оборудования и соблюдением дополнительных требований. Подобные технологии химического гидролиза являются достаточно трудоемкими и вредными. Внедрение данного метода гидролиза требует дополнительного оборудования для очистки гидролизатов [25, 53, 96].

Приемлемой альтернативой использованию химического или физического гидролиза является применение протеаз (ферментативный гидролиз), то есть ферментных препаратов, получаемых из клеток животных, микроорганизмов или искусственно синтезированных. Ферментативный гидролиз (ФГ) белкового субстрата основывается на биохимических процессах [99]. В гидролизатах, получаемых в результате ферментативного гидролиза ПСО, сохраняется значительное количество азотсодержащих веществ с различной молекулярной массой, а так же каротиноиды и липиды [59, 99].

ФГ панцирных отходов является перспективным направлением переработки гидробионтов. Использование ФГ позволяет получать пищевые продукты с разным количественным и качественным содержанием белка, липидов и каротиноидов [68]. Применение протеаз (ферментов) является более предпочтительным способом переработки ПСО по сравнению с другими методами проведения гидролиза, так как ферментные препараты имеют значительную специфичность воздействия на субстрат, а ФГ осуществляется в «приемлемых» условиях, что позволяет сохранять большинство пищевых компонентов, извлекаемых из ПСО, с разным количественным и качественным составом [63, 68].

Изучение ФГ белково-минерального сырья позволяет определить уровень депротеинизации субстрата, что необходимо учитывать при выборе ферментного препарата, сырья, его начального состояния, температурных режимов, а также продолжительности процесса ФГ [68].

При ФГ панциря ракообразных происходит разрыв связей не только между протеином и хитино-минеральным матриксом, но и между липидами, высвобождение которых положительно сказывается на хранимоспособности конечного пищевого продукта [68]. Также при гидролизе количественному и качественному регулированию

подвергаются такие параметры как молекулярное распределение азотосодержащих веществ (АСВ) и второстепенные продукты гидролиза (липиды, каротиноиды) [14, 63].

Для получения гидролизатов с необходимыми свойствами и составом к начальному белково-минеральному субстрату примешивают ферментные препараты с различными степенями очистки, культивированные штаммы микроорганизмов, измельченные пищеварительные системы животных, которые являются катализаторами гидролитических процессов [178]. В зависимости от вида катализатора типы гидролиза подразделяются на микробиологический гидролиз, автопротеолиз, а также гидролиз с внесением протеаз разной степени очистки (протеолиз).

Микробиологический способ основан на использовании ферментов стартовых культур микроорганизмов (например, *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Licheniformis*) или собственной микробиоты ПСО [166]. Процесс бактериологического гидролиза осуществляется практически при тех же режимах, что и при использовании ферментных препаратов. К достоинству данного способа можно отнести невысокую себестоимость стартовых культур по сравнению с ферментными препаратами. К недостаткам способа относится высокая микробиологическая обсемененность, что несет дополнительные издержки на очистку гидролизатов. Также существенным недостатком такого способа является необходимость строго контролировать технологический процесс, так как возрастает вероятность раннего окисления жировой фракции, развития посторонней микрофлоры, что в свою очередь подразумевает проведение высокотемпературной инактивации микроорганизмов на завершающем этапе производства. Перечисленные недостатки способа ведут к усложнению технологического процесса и снижению качества получаемого пищевого гидролизата [152].

Применение собственной микробиоты в качестве протеазы также используется для выделения гидролизата из белково-минерального субстрата. Данный способ частично основан на использовании собственных протеаз микробиоты с добавлением химических катализаторов (например, углеводов, органических кислот). К данному гидролизу также относится и использование остаточных ферментов ПСО (автопротеолиз). Использование внутренних ферментов ПСО позволяет сократить издержки за счет отказа от коммерческих ферментных препаратов и штаммов микроорганизмов. Однако данный способ ограничен возможностью использования только сырых панцирных отходов, а интенсивность ФГ зависит от непостоянной активности собственных ферментов, что делает процесс менее управляемым. К недостаткам также можно отнести высокую микробиологическую обсемененность конечного продукта, что требует внесения дополнительных консервирующих агентов или применения различного вида обработок,

направленных на снижение или полное подавление нежелательной микрофлоры (например, химическая или температурная стерилизация) [12, 113,137].

Результаты исследований отечественных ученых позволяют применять некоторые виды гидробионтов (например, измельченную сайру, кильку и так далее) в качестве дешевой альтернативы ферментным препаратам [103, 109]. Однако применение такого способа ФГ затрудняет контроль степени гидролиза белка, отщепленного от панцирного субстрата, что не позволяет вырабатывать гидролизаты с желаемыми свойствами [102].

Применение для гидролиза вносимых ферментов является хорошей альтернативой при получении белковых гидролизатов с заданными параметрами (например, степенью гидролиза белка), что объясняется более широкой специфичностью добавляемых протеаз, а также возможностью косвенно или напрямую влиять на основные параметры гидролиза [102, 103].

Для регулирования заданных параметров гидролиза нужно учитывать специфичность и оптимумы активности фермента, степень очистки и его влияние не только на пептидные связи, но и на липиды, липокаротиноиды, каротинопротеины, хитин, каротиноиды (астаксантин) [60, 179]. Во многом протеолитическая активность фермента по отношению к субстрату в значительной степени зависит от начальной концентрации препарата [59].

Продолжительность ФГ в зависимости от начального состояния сырья и дозировки фермента может находиться в пределах 2–12 часов. Для получения низкомолекулярных белковых гидролизатов или изолятов продолжительность процесса может быть увеличена до 24 часов и более [12].

Условно ФГ (протеолиз) ПСО можно поделить на несколько этапов. Первый этап характеризуется высокой скоростью реакции, что объясняется отщеплением от субстрата высокомолекулярных пептидов. При этом гидролизу подвержена только треть всего белкового субстрата. На первом этапе отношение небелкового азота (НБА) и общего азота (ОА) соответствует 41 % к 43 %. Второй этап обуславливается ростом НБА к ОА. Третий этап – это стадия глубокого распада дезагрегированного белка на низкомолекулярные азотистые соединения [12]. Процесс глубокого распада высокомолекулярных пептидов с образованием низкомолекулярных может осуществляться как последовательно, так и параллельно. Параллельные реакции гидролиза зависят в первую очередь от однородности начального белкового субстрата и дозировки фермента. Однако использование фермента для получения гидролизата, состоящего из одних аминокислот, проблематично, так как на третьем этапе активность ферментного препарата снижается за счет ингибирующего влияния образовавшихся аминокислот (в случае использования щелочных и нейтральных

протеаз) [4]. Опубликованные исследования показывают, что при ФГ белкового субстрата отношение аминного азота к ОА (степень гидролиза азотсодержащих молекул) составляет не более 55 % [59]. Исследования дальневосточных ученых по гидролизу ПСО камчатского краба (*Paralithodes camtsaticus*) протеазами, выделенными из его гепатопанкреасы, показали, что уровень депротеинизации ПСО составил 70–75 %, от общего значения. Для извлечения оставшихся молекул белка необходимо использовать органические растворители или дополнительные ферменты узкой специализации [52].

Фермент при воздействии на белок (при протеолизе) нарушает гистологическую структуру субстрата с последующим изменением консистенции и цвета [12]. Классический метод проведения ФГ отходов переработки гидробионтов, в том числе ПСО (рисунок 1.4), включает в себя подготовку сырья (измельчение, смешивание), ферментативный гидролиз сырья, инактивацию ферментного препарата, удаление примесей, концентрирование / сушку [70].



Рисунок 1.4 – Традиционная технологическая схема проведения ФГ

Использование ферментных препаратов позволяет, с одной стороны, более точно регулировать процесс, с другой – значительно уменьшить его продолжительность по сравнению, к примеру, со способом, основанным на внесении культур микроорганизмов, что в свою очередь позволяет получать пищевые компоненты с высокой биологической ценностью.

В последние годы некоторые ферменты, такие как алкалаза, протосубтилин, папаин, были предложены учеными как утилитарная альтернатива животным протеазам при

извлечении пищевых комплексов из отходов переработки ВБР, в том числе и ПСО. Их использование позволило получить пищевые белковые гидролизаты с желательными физико-химическими свойствами при меньшем количестве химических загрязнений [132].

Однако применение некоторых микробиологических ферментов не позволяет эффективно использовать механические методы фракционирования и осаждения (например, центрифугирование, сепарирование), что связано с образованием устойчивых эмульгированных систем типа вода / ПАВ / липид. Образование эмульсий может быть связано со специфичностью субстрата, особенностями ферментного препарата, а также с режимом проведения гидролиза ПСО [63]. Динамика образования эмульсий определяется устойчивым распределением одной жидкости в другой в виде микрокапель [61].

Существующий способ снижения дисперсных образований при получении пищевых белковых гидролизатов с приемлемым уровнем жира (не более 2,5–3 %) разработан учеными А. П. Черногорцевым и Р. Г. Разумовской. Предложенный способ подразумевает частичный гидролиз (или автопротеолиз) с высвобождением высокомолекулярных белковых комплексов, находящихся в составе белковой суспензии и дальнейшим термическим осаждением белков [96]. Подобная комбинация методов позволяет эффективно отделить липидную фракцию от белкового субстрата. Недостатком такого способа является температурное разрушение витаминов, каротиноидов (астаксантина) и каротинопротеинов [210].

Еще одним возможным способом снижения образования эмульсий в гидролизате является предварительная гидромеханическая депротеинизация (гидромеханическое удаление мягких слоев эпителия) неизмельченных ПСО на пресс-сепараторе с последующим введением солевого раствора или замораживанием образовавшейся суспензии [67, 94]. Такое технологическое решение позволяет удалять значительную часть липидов перед ФГ, снижая их концентрацию в субстрате [67]. Применение предварительной гидромеханической депротеинизации ПСО в комбинации с подобранными режимами гидролиза позволяет, с одной стороны, снизить долю жира в плотной (белковой) фракции, а с другой – снизить количество дисперсных образований в жидкой части гидролизата (водной фракции). Необходимо учитывать и температуру, при которой проводится предварительная гидромеханическая депротеинизация, так как при температуре в 40–45 °С липиды обладают меньшей вязкостью, а белки лучше растворяются в воде и, как следствие, происходит лучшее их извлечение из ПСО. Однако при таком методе возрастает концентрация эмульсий, что требует внедрения дополнительных технологических способов разрушения гетерогенных образований,

например, добавления солевого раствора, специфичных ферментов, органических кислот и замораживания суспензии при минус 30 °С [67].

Другая проблема при выделении пищевых компонентов посредством протеолиза ПСО – высокая температура инактивации и себестоимость ферментного препарата. Экономический аспект значительно препятствует эффективному внедрению технологии ФГ для ПСО с последующим выделением биологически ценных пищевых компонентов (например, астаксантин) [67].

Возможное решение данных проблем заключается в поиске механизмов управления процессами образования эмульсий, что возможно при использовании недорогой протеазы, обладающей необходимой специфичностью воздействия на субстрат, с невысокой температурой инактивации, а также применение низкотемпературной предварительной гидромеханической депротеинизации в составе многоступенчатой модели ФГ панцирного субстрата [194]. В качестве недорогой альтернативы ФГ субстрата можно рассмотреть протеазы микробиологического происхождения [173, 212].

1.3 Обоснование выбора фермента для гидролиза панцирьсодержащих отходов

Подбор протеазы осуществлялся исходя из основных параметров, непосредственно влияющих на уровень депротеинизации белково-минерального субстрата, температуры инактивации и специфичности воздействия на субстрат, так как при разработке технологии выделения белкового гидролизата посредством ФГ, необходимо учитывать возможную интенсивность образования пептидов, обладающих выраженными поверхностно-активными свойствами.

1.3.1 Общая характеристика протеолитических ферментов

Ферментативный гидролиз белкового субстрата имеет высокое значение при выработке гидролизатов для пищевой промышленности [26, 35, 60, 94]. Протеолитические ферменты синтезируются бактериями, грибами, растениями, животными [65]. Средняя молекулярная масса ферментов составляет от 12 кДа до 1 000 кДа (рисунок 1.5), в некоторых случаях молекулы биокатализаторов превышают молекулы белковых субстратов, близкие к величинам коллоидных остатков [57].



Рисунок 1.5 – Пример величины молекулы катализатора (фермента) к молекуле субстрата

Протеолитические ферменты применяются для гидролиза различных белковых субстратов в пищевой промышленности, а также при выработке кормов для крупнорогатого скота [86, 97, 101]. В пищевом производстве ферменты могут использоваться для производства хлебобулочных изделий, а также для изготовления различных сыров и молочной продукции.

Все биомодификаторы (ферменты) подразделяются на две группы:

- монокомпонентные, в состав которых входят аминокислотные остатки и высокомолекулярные протеины без химических групп;
- бикомпонентные, в состав которых входят белки-апоферменты и небелковые вещества (кофакторы).

Кофакторы выполняют роль веществ неорганической природы (ионы Fe, Mn, Zn) или сложных веществ органической природы, то есть коферментов, при этом в некоторых, случаях они могут связываться с белковыми комплексами, образуя связи – прочные или нестабильные. В некоторых случаях бикомпонентные апоферменты называют белковыми носителями, а протеазу относят к протеолитической (активной) группе [99, 105, 107, 177].

При ФГ протеазы имеют свои особенности и являются биокатализаторами. Это происходит за счет наличия в препаратах нескольких активных центров воздействия на субстрат при промежуточных стадиях гидролиза и возможных параллельных многостадийных реакциях. Специфичность воздействия фермента на субстрат в значительной степени обуславливается последовательностью L-аминокислот и их объемным расположением в цепи [86, 97]. Также важно учитывать и концентрацию биокатализатора к субстрату (рисунок 1.6).

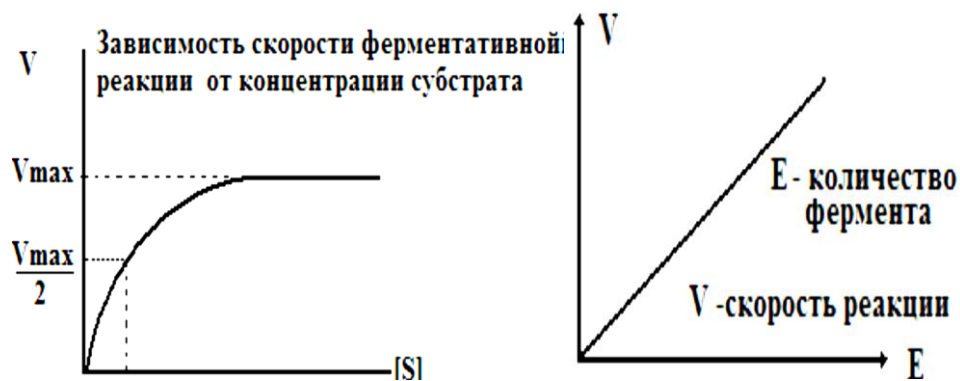


Рисунок 1.6 – Зависимость скорости ФГ от концентрации фермента

Применение протеаз при гидролизе в зависимости от их концентрации значительно повышает скорость протекания биохимических процессов (рисунок 1.6). При подборе протеазы также необходимо учитывать множество дополнительных факторов: температуру проведения гидролиза, концентрацию протеазы в растворе, водородный показатель (pH), гидромодуль и т.д. [33].

1.3.2 Влияние температуры на скорость протеолитической реакции

Изменение температуры напрямую влияет на стабильные характеристики протеазы и интенсивность ее воздействия на белковый субстрат. При использовании ферментного комплекса необходимо учитывать значения температурного коэффициента для каждой протеазы. При повышении температуры для ферментативной реакции, где в качестве катализатора используется протеаза, применяется общепринятое правило Вант-Гоффа (формулы 1.1 и 1.2):

$$V_{t_2} = V_{t_1} \times \gamma^{\Delta t/10}, \quad (1.1)$$

где V_{t_2} – скорость при температуре t_2 ;

V_{t_1} – скорость при температуре t_1 .

$$\Delta t = t_2 - t_1, \quad (1.2)$$

$\gamma = 2-4$ – температурный коэффициент.

При достижении высоких температур (более 68–70 °C) активность ферментного препарата также замедляется (рисунок 1.7) и в дальнейшем полностью прекращается, в результате чего происходят изменения структуры активного центра при тепловой

денатурации, вследствие чего фермент теряет способность воздействовать на субстрат [57, 58, 107, 105]. Если температура, напротив, низкая, то реакция ферментативного гидролиза находится на низких значениях. А при значении температур, близких к криоскопической, активность ферментов практически незаметна [32].

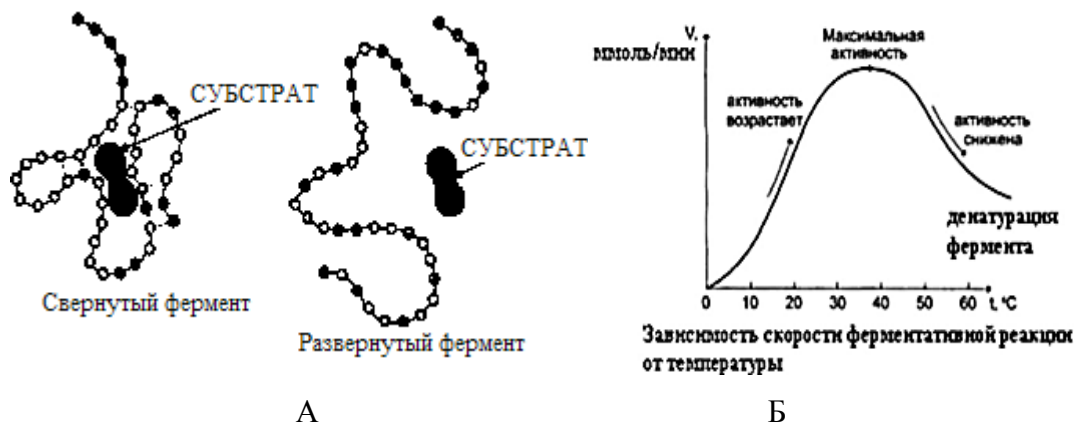


Рисунок 1.7 – Влияние температуры на фермент (А) и скорость протеолитической реакции (Б)

При проведении ФГ белково-минерального субстрата необходимо соблюдать и поддерживать установленные температурные оптимумы (рисунок 1.7). Для протеаз животного происхождения чаще всего температурные оптимумы находятся в пределах от 30 до 45 °С, для ферментов бактериального или грибкового происхождения температурные оптимумы могут варьироваться в пределах от 25 до 50 °С. Однако при проведении высокотемпературного ФГ глубинному изменению подвержены как сопутствующие, так и основные компоненты гидролиза (астаксантин, белок), что важно учитывать при разработке технологии выделения белкового гидролизата (БГ) из ПСО [3, 52].

1.3.3 Влияние водородного показателя на скорость протеолитических реакций

Во многих случаях водородный показатель (рН) оказывает не меньшее влияние на скорость проведения реакций ФГ, чем температура. Только при определенных концентрациях ионов водорода происходит воздействие активного центра на белковый субстрат. Отклонение рН от необходимого оптимума изменяет степень ионизации основных и кислых групп в составе аминокислот, входящих в активные центры фермента (рисунок 1.8).

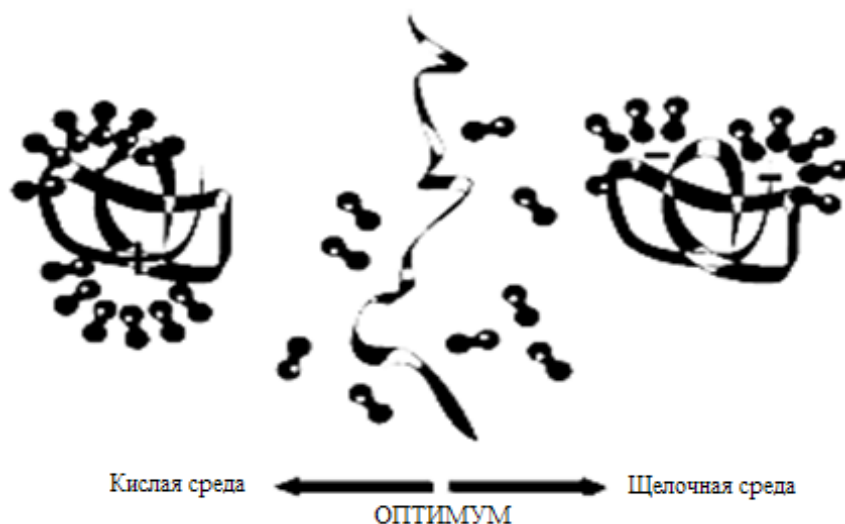


Рисунок 1.8 – Влияние pH на активный центр фермента при ФГ

При смещении pH в кислотную / щелочную сторону происходит изменение структуры белка протеазы и, как следствие, изменяется ее воздействие на субстрат, а в некоторых случаях это приводит к денатурации белковых компонентов фермента или к критической инактивации активного центра (рисунок 1.8) [27]. Для каждого ферментативного препарата существуют собственные оптимумы водородного показателя, что чаще всего зависит от сырья, из которого был получен фермент [57, 58, 87].

1.3.4 Влияние гидромодуля на ферментативный гидролиз

При проведении гидролиза ПСО, особенно измельченного, немаловажным фактором является количество добавляемой жидкости (воды) – гидромодуль. Данный показатель напрямую влияет на массовый выход продуктов гидролиза (интенсификацию диффузионных процессов), а также на затраты при дальнейшем концентрировании сухих веществ гидролизата [119].

Использование воды при ФГ необходимо для более равномерного распределения ферментов по субстрату, а также при перемешивании для быстрого удаления отщепившихся от субстрата белковых молекул (взвесей). В некоторых случаях при проведении ФГ гидромодуль может быть частичным регулятором pH [111].

Необходимо учитывать, что при высоком значении гидромодуля может увеличиться скорость ингибирования ферментов конечными продуктами распада белков (аминокислотами). Также значение гидромодуля влияет на количество осаждаемых продуктов гидролиза ПСО, так как часть компонентов может перейти в растворенное состояние или локализоваться в эмульгированной системе, в результате чего снижается

количество осаждаемых сухих веществ посредством центрифугирования или сепарирования [119].

1.3.5 Кинетика ферментативного гидролиза

Динамика роста гидролиза пропорциональна количественному значению молекул, свободная энергия которых зависит от энергии их активации, и, следовательно, с ростом температуры в пределах оптимумов их доля возрастает. Протеазы при воздействии на субстрат увеличивают положительные значения вступающих в реакцию молекул белка, что достигается за счет снижения энергетических барьеров. При взаимодействии молекул фермента с молекулами субстрата происходит более значимая активация молекул, чем в реакции без ферментного катализатора. Некоторые протеазы обладают высокими показателями взаимодействия с молекулами субстрата при небольшой продолжительности процесса [10], что в свою очередь напрямую влияет на степень гидролиза белкового субстрата. Степень гидролиза белков – это основной биохимический показатель при активации ферментных препаратов [16, 20, 42].

Результативность гидролиза достигается посредством перехода основных и сложных реакций гидролиза на более легкие и простые. Следовательно, весь процесс ферментативного гидролиза делится на три основных стадии катализа (рисунок 1.9) [5, 65].

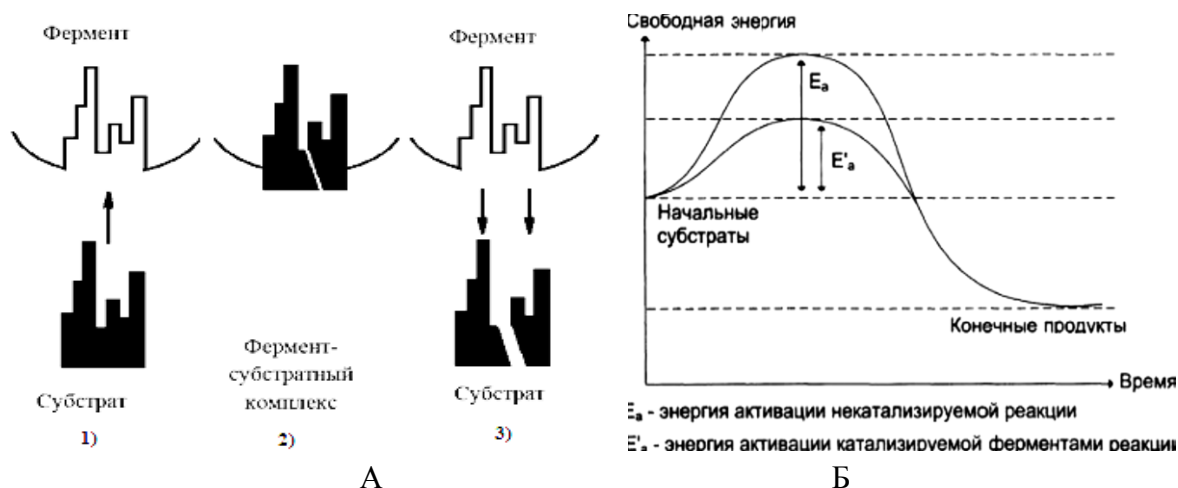


Рисунок 1.9 – Этапы ФГ субстрата

На первой стадии (рисунок 1.9 А) происходит ориентированная сорбция субстрата и активного центра фермента с образованием ферментно-субстратного комплекса (E-S), то есть происходит взаимодействие адсорбционных молекул центра с большинством молекул субстрата, вследствие чего получается конформационная структура с

возникновением слабых связей между центром и субстратом (рисунок 1.9 Б). Молекулы субстрата находятся в удобном положении для каталитического центра, но на данном этапе гидролиз все еще обратим, так как образовавшиеся типы связей еще слабы [65]. Вторая стадия (рисунок 1.9 А) характеризуется образованием химически преобразованного субстрата. Несколько молекул активного центра связываются с молекулами субстрата, активизируя его: наблюдается его реструктуризация и деформация за счет разрыва ковалентных связей и возникновения новых. Данный этап достаточно продолжительный, но его влияние на скорость проведения ферментативного гидролиза более значительно (рисунок 1.9 Б). На третьей стадии (рисунок 1.9 А) происходит отделение готовой белковой взвеси от комплекса E-S за счет глубокого изменения, связанного с утратой способности находиться в связи с активным центром (рисунок 1.9 Б). Поэтому воздействие активного центра на сильно гидролизованный белок вероятно в меньшей степени, так как не образуются прочные связи [5, 65]. Проведение гидролиза белка ПСО и белковых взвесей необходимо осуществлять, не достигая третьей стадии катализа.

1.3.6 Ферменты, используемые для гидролиза панцирьсодержащих отходов

Используемые для гидролиза ПСО ферменты можно получить тремя способами. Первый способ основывается на экстракции протеаз при комплексной переработке внутренней секреции животных, в том числе рыб и ракообразных. Второй способ базируется на выделении препаратов из культивированных штаммов микроорганизмов или грибов. Третий способ основывается на искусственном синтезе ферментов из аминокислот посредством биоимитации. В пищевой промышленности чаще всего используют препараты, полученные первым и вторым способом [16, 63].

В соответствии с документацией пищевая промышленность использует такие животные протеазы, как химотрипсин, трипсин, пепсин и многие другие, как в чистом виде, так и в комплексе с другими ферментными препаратами. Протеазы, выделенные из животных или гидробионтов, отличаются высокой активностью при умеренном оптимуме проведения ферментативного гидролиза [9].

Применение ферментативных препаратов микробиологической природы при переработке ПСО более эффективно с экономической точки зрения. Некоторые протеазы, выделенные посредством бактериального или грибного синтеза, могут обладать более широкой специфичностью воздействия на белково-минеральный субстрат, что может

обеспечить необходимую степень гидролиза белка, понизив долю жира конечного продукта и снизить нежелательные процессы, связанные с образованием эмульсий [3].

При выборе фермента для гидролиза панцирных отходов необходимо учитывать их специфичность – пространственное совпадение конфигураций субстрата и активного центра, а так же стереохимическую специфичность и компарментализацию (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Специфичность некоторых групп ферментов

Класс ферментов	Реагирующая группа	Ковалентное промежуточное соединение
Химотрипсин, трипсин, экстеразы, субтитизин, тромбин, эластаза	ОН (серин)	Ацилсерин
Папаин, фицин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	SH (цистеин)	Ацилцистеин
Щелочная фосфатаза, фосфоглюкомутаза	ОН (серин)	Фосфосерин
Сукцинилтиокиназа, фосфоенолпировиноградной кислоты-гексоза трансфосфорилаза	Имидазол (гистидин)	Фосфорилимидазол
Альдолаза, декарбоксилаза и пиродоксалевые ферменты	$>C=O$ и $>C=N$ (лизин и аминогруппа субстрата)	Основание Шиффа

Выбор ферментного препарата также определяется сложной совокупностью свойств протеазы, однородностью субстрата и определенным, коллоидным состоянием всей системы типа E-S. Иногда эффективность ферментативного гидролиза определяется индивидуальными особенностями протеазы к поликомпонентному субстрату при различных коллоидных состояниях (таблица 1.1) [76].

Опубликованные работы отечественных ученых показывают, что при гидролизе вареного сырья ряд протеаз неэффективен, что связано в первую очередь с низким воздействием активного центра фермента на денатурированный белок [11, 24, 39]. Следовательно, при подборе ферментного препарата необходимо учитывать, что ФГ термически обработанных ПСО может осуществляться с минимальной динамикой [139].

Протеазы, вырабатываемые из тканей животных, отличаются высокой активностью, скоростью проведения реакций и значительной степенью очистки, что позволяет достаточно быстро проводить ФГ разнообразных субстратов. Однако значительными недостатками таких препаратов являются высокая стоимость и в некоторых случаях

значительная продолжительность инактивации, что может привести к необратимым потерям компонентов гидролиза (витаминов, астаксантина).

Использование ферментных препаратов микробиологического происхождения при гидролизе ПСО является перспективным направлением при комплексной переработке. Применение микробиологических ферментов позволяет получать белковые гидролизаты, липиды, белковые гидролизаты (БГ), а также хитин с более желаемыми свойствами. Использование микробиологических протеаз позволяет более точно регулировать процесс гидролиза [67]. Однако из-за более широкой субстратной специфичности микробные протеазы в значительной степени уменьшают вязкость получаемых бульонов, тем самым увеличивая затраты на дальнейшее концентрирование сухих веществ гидролизата [67, 78, 210].

Следовательно, основные исследования, связанные с разработкой технологии выделения белкового гидролизата и сопутствующих компонентов при гидролизе ПСО должны быть направлены на снижение издержек, связанных с выделением из ПСО сухих веществ и их осаждением.

1.3.7 Используемое сырье для выделения микробиологических ферментов

В соответствии с документацией, в РФ существует жестко регламентированный перечень бактерий и грибов, разрешенный при выработке пищевых продуктов (таблица 1.2) и ферментных препаратов (таблица 1.3), каждые из которых обладают собственной специфичностью воздействия на субстрат, оптимумами (Опт), а также режимами инактивации (РИ).

Таблица 1.2 – Перечень разрешенных микроорганизмов для применения в пищевой промышленности

Бактерии, грибы	Получаемые ферменты	Субстраты разведения	Опт, °С / рН	РИ	Влияние на субстрат
<i>B. amyliquefaciens</i>	Изомеразы, амилаза, Альфа-амилаза	Мясопептонный бульон	Аэроб 34–37 °С рН 6,8 – 7,5	75 – 95 °С	Гидролиз внутренних- α -1,4-глюкозидных связей
<i>B. cereus</i>	Амилаза	Белково-пептонный агар	Аэроб 30–32 °С рН 9,0 – 9,5	75 – 95 °С рН 4,5-5,0	Расщепляют до кислоты глюкозу и мальтозу, высокая протеолитическая активность
<i>Mr. miehei, pusillus</i>	Ренин, кислотные протеиназы	Молочные субстраты	30–33 °С рН 4,0 – 4,5	50 °С	Расщепляют до кислоты глюкозу и мальтозу, высокая протеолитическая активность
<i>Str. cremoris</i>	Казеиногеназа	Молочные субстраты	25–30 °С рН 4,5 – 5,0	60 °С	Разрушают дисульфидные связи в молекулах структурных белков
<i>Str. lactis</i>	Лактаза	Молочные субстраты	30–36 °С рН 5,5	60 – 65 °С	Разрушает белково-липидную связь с образованием водорастворимых азотистых веществ
<i>Str. fradiae</i>	Кератиназа, калогеназа	Агаровые среды	Анаэроб 28–30 °С рН 7,4 – 7,7	65 – 70 °С	При гидролизе образуются укороченные пептидные цепочки

Результаты таблицы показывают, что применяемые в пищевом производстве штаммы микроорганизмов ПСО обладают широкой специфичностью воздействия на субстрат. Для переработки ПСО необходимо использовать очищенные ферментные препараты, выделенные из определенных штаммов микроорганизмов (таблица 1.3).

Таблица 1.3 – Перечень некоторых выделяемых микробиологических протеаз

Микроорганизмы	Выделяемые протеазы	Оптимумы роста	Воздействие на белковый субстрат
1	2	3	4
<i>Aspergillus awamori</i>	Химозин	pH 3,5–4,0 42–45 °C	Расщепляет белок К-казеин по связи <i>Phel</i> ₀₅ - <i>Met</i> ₀₆ , вызывая нестабильность мицелл казеина, что приводит к образованию сгустка
<i>Aspergillus melleus</i> (<i>quercinus</i>)	Экзопептидазы	pH 5,5–5,8 53–59 °C	Отщепление аминокислот с концов полипептидной цепи
<i>Aspergillus niger</i>	Вакуолярная серин-протеаза	pH 7,3–11,0 55–70 °C	Катализирующие процесс деградации (протеолиз) белков на составляющие их молекулы α-аминокислот посредством гидролиза пептидной связи
	Химозин	pH 3,5–4,0 42–45 °C	Расщепляет белок К-казеин по связи <i>Phel</i> ₀₅ - <i>Met</i> ₀₆ , вызывая нестабильность мицелл казеина, что приводит к образованию сгустка
<i>Aspergillus oryzae</i>	Кислые протеазы	pH 3,0–4,5 30–45 °C	Разрушают гетерологичные белки и нативные структуры
<i>Aspergillus terricola</i>	Терридеказа	pH 4,5–6 30–45 °C	Гидролиз муцина
<i>Bacillus amyliquesfaciens</i>	Субтилизназа	pH 9,0–10,0 35–45 °C	Гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами
<i>Bacillus cereus</i>	Глутамилэндопептидаза	pH 8,5–9,5 45–55 °C	Расщепляет пептидные связи, образованные α-карбоксыльными группами глутаминовой и аспарагиновой кислоты
<i>Bacillus licheniformis</i>	Кератиназа	pH 5,0–12,0 50–55 °C	Широкий спектр воздействия на субстрат: казеин, порошок из перьев, эластин, коллаген
	Субтелизин	pH 9,0–10,0 35–45 °C	Гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами
	Алкалаза FG	pH 6,0–10,0 26–60 °C	Гидролиз включает нуклеофильную атаку Ser221 карбонильной группы субстрата с образованием ацилфермента, который затем гидролизуется водой
<i>Bacillus mesentericus</i>	Полипептидаза	pH 6,5–7,5 37–40 °C	Отщепляющийся С-концевой дипептид
	Дипептидаза		

Продолжение таблицы 1.3

1	2	3	4
<i>Bacillus subtilis</i>	Субтелизин	pH 9,0–10,0 35–45 °С	Гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами
	Протосубтилин	pH 6,5–7,5 35–45 °С	Гидролизует связи - CO NH - с образованием пептидов низкого молекулярного веса и аминокислот
	Амилоризин П10х	pH 4,7–5,4 40–45 °С	Комплекс протеолитических ферментов с превалирующим действием α -амилазы
	Амилосубтилин Г10х	pH 6,0–6,3 50–55 °С	Высокая термостабильность, высокая протеолитическая активность
<i>Brevibacterium linens</i>	Протеиназа Б	pH 6,5–8,5 20–30 °С	Распознает и гидролизует пептидные связи, соседствующие с карбоксильной группой алифатических и ароматических аминокислот с закрытой альфа-амино группой, гидролизует кератин
<i>Endothia parasitica</i>	Реннин	pH 4,0–5,5 25–35 °С	Действует на наружные звенья гидрофобных остатков в точках P_1 и P_1'
	Супарен		
<i>Mucor miehei</i> <i>Mucor pusillus</i>	Реннилаза Фромаза Марзим Фурин Эмпораза	pH 5,5–7,0 30–40 °С	Разрушает пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотными остатками: связи фенилаланин–валин, лейцин–тирозин, фенилаланин–фенилаланин или фенилаланин–тирозин, разрушает казеин
<i>Streptomyces fradiae</i>	Субтилизназа	pH 9,0–10,0 35–45 °С	Гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами

Использование ферментных препаратов микробиологического происхождения позволяет в значительной степени произвести депротеинизацию панцирных отходов за счет более широкой специфичности активного центра (таблица 1.3). Однако это уменьшает вязкость гидролизата, увеличивая потерю сухих веществ в водной фракции, в растворенном или эмульгированном состоянии.

Такие ферменты, как алькалаза, протосубтилин и папаин, рекомендуются для извлечения белка из отходов переработки ВБР, в том числе и из ПСО, так как их специфичность позволяет получить белковые гидролизаты с желаемыми

технологическими и физико-химическими свойствами при меньшем количестве химических загрязнений [176, 137].

Однако высокая температура инактивации алькалазы и папаина не позволяют полноценно сохранить каротиноиды (астаксантин) и витамины в составе БГ. Также алькалаза (щелочная) и папаин известны как протеазы с более высокими тенденциями к образованию пептидов, обладающих выраженными поверхностно-активными свойствами, что может быть причиной интенсивного эмульгирования белков, липидов и каротиноидов с последующей их потерей при концентрировании сухих веществ [114, 132].

Применение протеаз микробиологического происхождения для выделения пищевого белкового гидролизата из вареных ПСО имеет ряд ограничений. В первую очередь это связано с недостаточной изученностью воздействия микробиологических ферментов на вареный белково-минеральный субстрат. В качестве схожих данных использовались значения по гидролизу частично денатурированного молочного белка (таблица 1.4). Для сравнительных характеристик использовались ферменты разной природы происхождения, рекомендованные для протеолиза сырых панцирных отходов [14, 46, 28].

Таблица 1.4 – Специфичность воздействия некоторых протеаз на термообработанный молочный белок

Фермент, используемый для частичного протеолиза	Количество расщепленных протеинов в гидролизате, %			Соотношение α -АА / ОА, %
	β -лг	α -ла	БСА	
Термолизин	100,0	100,0	0,0	23,3 ± 0,6
Папаин	61,6 ± 4,9	30,0 ± 4,5	0,0	13,7 ± 1,0
Пепсин	0,0	100,0	100,0	12,7 ± 1,3
Трипсин	100,0	100,0	0,0	18,2 ± 0,6
Нейраза	77,9 ± 3,9	29,8 ± 3,6	0,0	16,8 ± 0,8
Алкалаза	100,0	100,0	0,0	17,8 ± 1,0
Протосубтилин	94,9 ± 2,4	71,9 ± 3,2	0,0	15,1 ± 1,1

Установлено, что такие протеазы, как алкалаза и протосубтилин, показали сопоставимые результаты в сравнении с ферментными препаратами животного происхождения (например, трипсина) (таблица 1.4). Однако, учитывая критическую для каротиноидов (астаксантина) температуру инактивации алькалазы, ее использование при выделении белкового гидролизата нецелесообразно. Соответственно, протосубтилин является рациональной протеазой для выделения пищевого БГ и сопутствующих компонентов из ПСО [67].

1.3.8 Характеристика фермента протосубтилина ГЗх

Протосубтилин – мультифермент (комплекс ферментов), получаемый из бактериальной культуры *Bac.subtilis*. Промышленностью вырабатывается несколько видов данного фермента – ГЗх, Г10х, Г20х и Г25х, соответственно каждый из них имеет различную степень очистки от минеральной примеси и сторонних непротеолитических ферментов (глюканазы, амилазы и т.д.). Разные степени очистки обеспечивают разницу в концентрациях нейтральных и сериновых протеаз, а, следовательно, и в интенсивности процесса расщепления (гидролиза) белка. При большей концентрации сериновых протеаз оптимумы проведения гидролиза должны иметь более щелочную направленность [192].

Также предполагается, что высокая концентрация щелочных экзопроteaseз напрямую влияет на образование пептидов (рисунок 1.10), имеющих гидрофобные и гидрофильные окончания и влияющих на образование многофазных микрогетерогенных систем типа вода / ПАВ / липид (эмульсии).

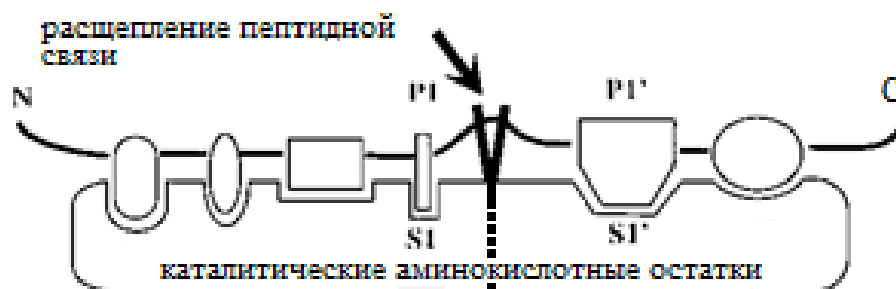


Рисунок 1.10 – Действие активного центра щелочных протеаз на белковый субстрат

Активный каталитический центр щелочной протеазы состоит из трех аминокислот (Asp, His, Ser). При расщеплении субстрата разрыв связей происходит по позициям P₁ и P₁', с образованием пептидов с гидрофильными цепями аминокислот на одном конце и гидрофобными аминокислотами на другом (рисунок 1.10). При контакте с водой часть пептидов сворачивается в «клубок», внутри которого находятся гидрофобные полипептиды со связанными липидами и каротиноидами, а на поверхности данного клубка находятся гидрофильные группы [40, 61, 205], что в свою очередь снижает интенсивность перехода протеинов в плотную фракцию при центрифугировании [183].

Нейтральные протеазы, напротив, расщепляют субстрат, сопровождаясь образованием пептидов с гидрофобными или гидрофильными боковыми цепями аминокислот – Val, Leu, Ile, Phe [95]. Подобная конфигурация и характеристика окончаний в меньшей степени способствует образованию дисперсных систем при ФГ с

последующей потерей белков и каротиноидов в водной фракции в эмульгированном состоянии.

Следовательно, при выборе ферментного препарата для гидролиза панцирных отходов вареной северной креветки необходимо использовать комплекс протеаз, в котором концентрация щелочных экзопротеаз будет минимальна по отношению к концентрации нейтральных протеаз и к легкодоступной белковой части клеточного слоя ПСО. Необходимое соотношение концентраций протеаз к белковому субстрату соответствует препарату протосубтилину ГЗх (ПГЗх) нейтральному (таблица 1.5), так как с увеличением степени очистки фермента соотношение нейтральных и щелочных протеиназ (1,4 / 1,0) не изменяется, а отношение щелочной протеазы к легкодоступным белкам увеличивается, что будет напрямую влиять на интенсивность образования пептидов, обладающих поверхностно-активными свойствами.

Таблица 1.5 – Общеферментный состав протосубтилина ГЗх

Фермент	m, ед/мг	m, г/г	Активн. фермен. ед/мг	Оптимум роста	m _{мол} , кДа	Специфичность действия
1	2	3	4	5	6	7
Нейтральная протеаза	75	$\approx 3 \times 10^{-12}$	120 ± 7	рН 6,8-8,0 35–50 °С	35-40	Способна разрушать все типы белковых матриц, образует длинноцепочечные пептиды, высвобождает аминокислоты с гидрофобными свойствами
Щелочная (сериновая) протеаза	45	$\approx 1,8 \times 10^{-12}$	до 1000	рН 8,0–10 30–55 °С	27-30	Образует АСВ с поверхностно-активными свойствами, двухступенчатая реакция гидролиза, основное отличие от других протеаз – наличие в своем активном центре аминокислоты, серина

Продолжение таблицы 1.5

1	2	3	4	5	6	7
Глюканаза	40	$\approx 1,2 \times 10^{-12}$	до 200	pH 2,5–6,0 35–60 °C	≈ 31	Фермент эндогенно катализирует гидролитическое расщепление внутренних β -1,3- или β -1,4-связей в β -глюканах, у которых глюкозный остаток замещен в положении C ₃
β - Ксиланаза	1	$\approx 2,3 \times 10^{-14}$	до 150	pH 2,6–6,1 35–60 °C	≈ 23	Гидролизует 1,4- β -D-ксилазы путем последовательного отщепления от нередуцирующего конца полисахарида и ксилобиозы остатка D-ксилозы
A-амилаза	5	$\approx 2,2 \times 10^{-13}$	до 300	pH 6,5–7,2 55–65 °C	≈ 45	Расщепляет крахмал, гликоген и некоторые продукты их частичного распада, отщепляют от нередуцирующих концов молекул гликогена и крахмала мальтозу,

Концентрация нейтральной протеазы в ПГЗх составляет 140 % концентрации щелочной протеазы (таблица 1.5). Предполагается, что подобное соотношение щелочной и нейтральной протеазы в ПГЗх при ФГ белка ПСО позволит снизить концентрацию эмульсий в водной фракции, полученной после центрифугирования фильтрованного гидролизата.

Применение ПГЗх при гидролизе ПСО также может быть экономически обоснованно, так как рыночная стоимость фермента значительно ниже (от 0,3 до 0,5 руб/г) по сравнению с другими микробными протеазами.

1.4 Способы осаждения и обезвоживания компонентов, выделяемых при ферментативной обработке панцирьсодержащих отходов

Осаждение продуктов гидролиза тепловым способом. Использование теплового (физического) фактора для осаждения продуктов гидролиза основывается на изменении нативной конформации структуры белка, в результате чего происходит разрушение связей между белковыми комплексами с частичным высвобождением липидов. Белки выпадают в виде хлопьев и отделяются от жидкой части гидролизата посредством фильтрования или центрифугирования. Астаксантин, входящий в состав белкового гидролизата, при тепловой обработке меняет форму или разрушается. Применение тепловой обработки для осаждения компонентов гидролизата снижает концентрацию астаксантина в конечном продукте. Учитывая это, не следует рассматривать данный способ осаждения при разработке технологии выделения пищевого БГ из ПСО [114, 132].

Осаждение продуктов гидролиза центрифугированием. Осаждение компонентов гидролизата методом центрифугирования основывается на различном поведении молекул в центробежной системе. Так как гидролизат имеет в своем составе компоненты различной молекулярной массы, формы и плотности, то под воздействием центробежной силы происходит фракционирование по схожим значениям (рисунок 1.11), в том числе липидов и белков [97, 104].

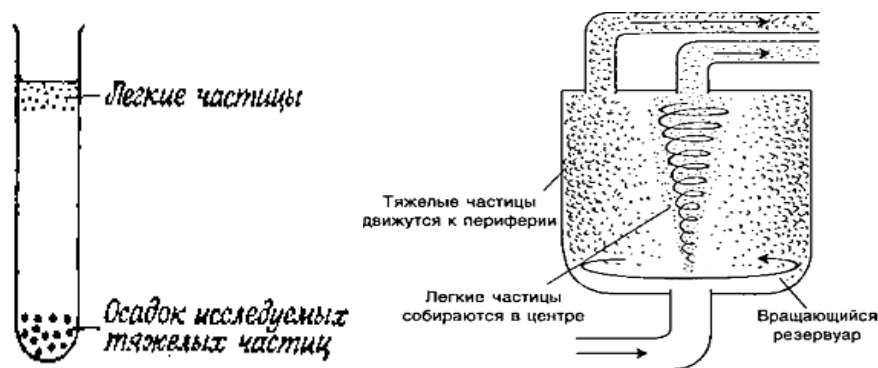


Рисунок 1.11 – Разделение веществ при центрифугировании

При центрифугировании гидролизатов необходимо учитывать вязкость и плотность среды, а также объем связанной / свободной жидкости, количество которой в свою очередь зависит от степени гидролиза белковых взвесей фильтрованного гидролизата. Скорость и продолжительность вращения ротора центрифуги необходимо менять пропорционально вязкости среды. Например, при осаждении низкомолекулярных

сферических гомогенных частиц жидкого гидролизата необходимо применять высокие обороты ротора, так как это способствует более интенсивному осаждению компонентов [69].

Осаждение компонентов гидролизата может осуществляться как на дно, так и вдоль стенок. Кроме того при значительном присутствии гидрофобных молекул уменьшается гидратация, что снижает количество связанной воды, тем самым улучшая осаждающие возможности центрифуги. Центрифугирование (или сепарирование) достаточно распространено при фракционировании жидкостей, в том числе и жидких гидролизатов. Однако осаждению подвергаются в большинстве случаев только высокомолекулярные и длинноцепочечные соединения с гидрофобными цепочечными окончаниями. Осаждение растворенных пептидов или эмульгированных образований при обычных режимах, без применения ультрацентрифугирования, затруднительно и требует дополнительных технологий осаждения (например, осаждающими агентами) [69].

Осаждение продуктов гидролиза мембранным фильтрованием. Осаждение сухих веществ гидролизата посредством мембранного фильтрования – достаточно новое направление их концентрирования. Особенностью данного метода является использование мембранного элемента, представляющего собой мембранный фильтр, выполненный из неорганического и инертного материала, с микро / нано отверстиями (рисунок 1.12).



Рисунок 1.12 – Мембранное фильтрование гидролизата

Принцип осаждения основан на пропускании жидкого гидролизата через рабочую мембрану под давлением, в результате чего на фильтре остается все, что не прошло через мембрану, то есть до 98–99 % сухих веществ гидролизата (рисунок 1.12). Извлеченный таким способом плотный осадок гидролизата может иметь низкое значение воды (60–70 %), что снижает технологические издержки, связанные с последующим обезвоживанием [14, 15, 25].

Достоинством данного метода является возможность использования гидролизатов с высоким температурным значением (80 °С), а также дешевизна, простота, высокая производительность технологического процесса и возможность использования гидролизатов, рН которых может находиться от 2 до 13 [14, 25].

Однако основным недостатком такого метода является невозможность фракционировать липидную и белковую часть, что впоследствии может негативно повлиять на его дальнейшее применение и хранимоспособность. Дополнительное разделение компонентов возможно только при использовании системы поэтапного мембранного фильтрования, но этот способ для концентрирования сухих веществ гидролизатов технологически сложен и нерентабелен. Еще одним недостатком является относительно быстрое закупоривание «пор» мембранного элемента. Чаще всего это случается из-за липидных компонентов, теряющих свою пластичность при невысоких температурах. Снижение периодичности забивания мембранных каналов возможно при использовании гидролизатов с высокими температурными значениями (60–70 °С) [15, 25], но при таких температурных значениях выделяемый из ПСО астаксантин в составе белковых и липидных комплексов нестабилен и подвержен деструкции.

Следовательно, при разработке технологии выделения пищевого БГ из ПСО, обладающего желаемым соотношением астаксантина и жира, необходимо отказаться от применения мембранного фильтрования.

Осаждение продуктов гидролиза распылительной сушкой. Особенностью применения распылительной сушки является высокий коэффициент осаждения (до 99,1 %) сухих веществ за счет распыления отфильтрованного гидролизата через специальные форсунки в сушильной камере с заданной температурой и конвекцией воздуха. При распылении образуются микрокапли жидкости, увеличивается площадь соприкосновения с теплым воздухом (рисунок 1.13). Это способствует более интенсивному использованию тепловой энергии для последующего изменения агрегатного состояния воды [51].

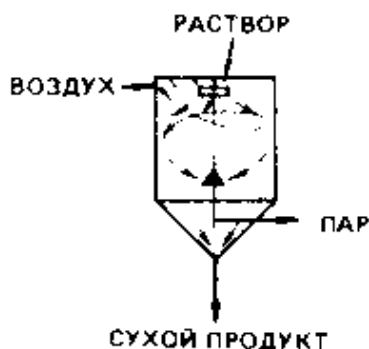


Рисунок 1.13 – Принцип работы распылительной сушки

Достоинством данного способа является высокий коэффициент осаждения сухих веществ и возможность параллельного обезвоживания, что снижает дальнейшие технологические издержки. Недостатком такого способа является невозможность отделения липидов, что повышает жирность конечного продукта. Еще один существенный недостаток – присутствие высокой температуры и кислорода, что в свою очередь отрицательно влияет на стабильность астаксантина, так как при применении распылительной сушки белковых гидролизатов происходит деструкция астаксантина с последующим снижением биологической ценности конечного белкового продукта.

Осаждение продуктов гидролиза химическим способом. Основная часть сухого вещества гидролизата – это протеиновые комплексы (до 92 % от массы сухих веществ гидролизата). При добавлении осаждающего реактива белок гидролизата взаимодействует с ионами металлов, спиртов, солей, кислот и щелочей, конкурируя за молекулы воды, с последующим ковалентным изменением структуры белка [54]. Технология осаждения протеинов органическими или минеральными кислотами основывается на необратимом разрушении электростатических связей с последующим уменьшением заряда, в результате чего белок выпадает в виде хлопьев в осадок.

Осаждение белков гидролизата также возможно посредством изменения рН среды. Подобное осаждение происходит за счет амфотерно-электролитических свойств протеинов, имеющих положительные и отрицательные заряды: при изменении изоэлектрической точки (изменении соотношения ионизированных групп) протеины приобретают гидрофобные свойства и выпадают в осадок [54].

Еще одной разновидностью технологии осаждения протеинов из гидролизатов является применение солей металлов. При добавлении дополнительных ионов металлов и солей происходит изменение изоэлектрической точки, в результате чего молекулы белков переходят из анионов в катионы. Вследствие такого изменения белки связываются с молекулами солей, теряя гидрофильные свойства, и выпадают в осадок. Преимущество химического способа осаждения сухих веществ безхитинового гидролизата – относительная простота и дешевизна процесса, а также микробиологическая чистота конечного продукта. Недостатком является невозможность фракционировать компоненты гидролиза, а также вероятность влияния химических агентов на основные или второстепенные компоненты гидролиза (например, на астаксантин) с последующим их разрушением, что требует дополнительных технологических издержек при удалении жидкости и в некоторых случаях дополнительной очистки. Следовательно, для осаждения растворенных или эмульгированных белковых компонентов гидролизата предполагается

применять соли (ацетата цинка, сульфата аммония и магния), рекомендованные для осаждения белковых бульонов и гидролизатов.

Осаждение компонентов гидролизата хитозаном. Изучению сорбционных свойств хитозана и его способов применения в различных отраслях промышленности, в том числе и в пищевой, посвящены сотни работ известных ученых: Л.В. Антиповой, В.М. Быковой, В.А. Варламова, Ю.М. Гафурова, В.И. Еремцева, Г.В. Масловой, С.Н. Максимовой, О.Я. Мезеновой, С.В. Немцева, К.Г. Скрябина, Т.М. Сафроновой и многих других.

Составляющие компоненты полимера (хитозана) включают в себя линейные полисахариды с β -1,4-связанной полимерной цепью, элементами которых являются глюкозамин и ацетил-глюкозаминовые (GlcNAc) звенья [180]. Особенностью такого строения и обуславливается линейность макромолекулы с частыми, полными витками вдоль оси [213]. Молекулярная масса хитозана в зависимости от типа начального сырья может находиться в пределах от 10 до 1000 кДа [56]. Хитозан не растворим в водной среде при нейтральных значениях pH, а в слабокислых жидких средах характеризуется повышением уровня вязкости и изменением полиэлектролитных свойств с образованием новых водородных связей между молекулами [18, 74, 75, 150, 169]. Хитозан обладает способностью связывать липидные и протеиновые комплексы за счет сорбционных свойств [37]. Важно учесть, что агрегационные свойства хитозана при осаждении липопротеиновых комплексов могут зависеть от их концентрации [48]. В пищевой промышленности использование хитозана достаточно распространено, так как помимо повышения реологических и структурообразующих свойств хитозан обладает энтеросорбентными, бактерицидными, противовоспалительными и антиокислительными свойствами [77, 80]. В существующих технологиях осаждения сухих веществ гидролизата хитозан используют в качестве осаждающего агента [171].

Предполагается, что при добавлении растворенного при pH 5,0–5,5 хитозана в водную фракцию гидролизата, полученного после фильтрования и центрифугирования, происходит выравнивание pH до нейтральных значений, так как гидролизаты, полученные при ФГ ПСО, имеют умеренно щелочное значение pH (7,5–8,0), вследствие чего хитозан теряет растворимость и, связанный с сухими веществами, выпадает в осадок. Применение хитозана при осаждении дисперсных образований гидролизата обосновано, в первую очередь, его высокими связывающими способностями, инертностью к основным компонентам ПСО, а также частичными антиокислительными свойствами, что положительно влияет на хранимоспособность конечного продукта.

Недостатком использования хитозана является значительная стоимость по сравнению с другими осаждающими агентами (например, солями металлов). Однако

возможное применение части вырабатываемого хитозана при комплексной переработке ПСО для осаждения сухих веществ гидролизата является возможным решением проблемы низкой экономической рентабельности применения хитозана в качестве осаждающего агента.

Способы обезвоживания плотной фракции гидролизата. Существующие способы удаления свободной воды из плотной фракции гидролизата основываются на изменении агрегатного состояния воды за счет поглощения ею подводимой энергии. Способы обезвоживания условно можно подразделить на сушку тепловую, сублимационную, вакуумную, ИК, СВЧ и комбинированную сушку. Необходимо учитывать, что классическая тепловая сушка осуществляется при неприемлемых для астаксантина условиях (температура, наличие кислорода или ультрафиолетового (УФ) излучения). Следовательно, применение классической тепловой или СВЧ сушки при обезвоживании белковой фракции нецелесообразно.

Вакуумная или сублимационная сушка осуществляется в безвоздушных средах. Несмотря на значительные технологические издержки, связанные с приобретением оборудования, данный способ обезвоживания наиболее приемлем. Однако стоит учитывать, что сублимационная сушка основана на изменении температуры с последующим замораживанием плотной фракции, что нежелательно для стабильности астаксантина [30, 82]. Следовательно, для обезвоживания выделенной плотной фракции при проектировании технологии переработки ПСО применение вакуумного обезвоживания является наиболее рациональным решением.

1.5 Механизмы формирования эмульгированной системы в декантированном гидролизате

Многофазные микрогетерогенные системы являются гомогенными, оптически прозрачными и термически устойчивыми дисперсиями типа вода – масло или вода – ПАВ – масло. Чаще всего дисперсные образования в гидролизатах или в белковых бульонах (водных фракциях) формируются за счет стабилизации поверхностно-активными веществами (ПАВ) нерастворимых в воде компонентов (например, масло) [120,156].

Маслом в данном случае может быть любое органическое вещество (чаще всего липидной природы), плохо растворимое в воде. При значительном межфазовом поверхностном натяжении компонентов типа вода – масло смешивания не происходит, однако введение / присутствие ПАВ снижает поверхностное натяжение двух фаз, что позволяет создавать устойчивые микрокапли, на поверхности которых находятся

молекулы стабилизирующего агента. Способность стабилизировать гомогенные системы обуславливается особенностями строения ПАВ – наличием основной заряженной гидрофильной группы молекул и продолжительного гидрофобного окончания [172]. Особенность такого асимметричного строения заключается в схожих показателях для обеих противоборствующих фаз: гидрофильная полярная группа приемлема для водной системы, а углеродная гидрофобная цепь – для неполярной фазы – масла (липидов) [1, 2, 151, 211].

Основной фактор, влияющий на образование эмульсий, – соотношение молекул ПАВ, при котором начинают образовываться мицеллы, то есть критическая концентрация вещества. Числовое значение мицелл в эмульсии увеличивается до тех пор, пока не будет достигнуто максимальное значение по отношению к концентрации молекул ПАВ. Также стабилизацию эмульсий (эмульгированных образований) может обеспечить присутствие дополнительных немицеллообразующих ПАВ с гидрофобными радикалами (со-ПАВ). Механизм действия со-ПАВ сопоставим с влиянием обычных ПАВ: гидрофобное углеводородное окончание находится в масле, а гидрофильная часть остается в воде [73].

Эмульсии гидролизатов делятся на макро– и микроэмульсии (таблица 1.6). Основное отличие микроэмульсий от макро – высокая термостабильность и значительная продолжительность существования дисперсных образований [175].

Таблица 1.6 – Сравнительные характеристики эмульсий гидролизата

Макроэмульсии	Микроэмульсии
<p>Неустойчивы Большие размеры капель до 20 мкм Внутренняя поверхность до 15 м²/г Высокое поверхностное натяжение до 10 мН/м Статистическая система</p>	<p>Термодинамическая стойкость системы Размеры капель не более 100 нм Внутренняя поверхность до 200 м²/г Низкое поверхностное натяжение до 10⁻³ мН/м Высокодинамичная система</p>

При ФГ ПСО чаще всего формируется трехкомпонентное (вода – ПАВ – масло) дисперсное образование. Процесс образования трехкомпонентной дисперсной системы может отображаться при помощи тройной фазовой диаграммы при стабильных температурных оптимумах и давлении (рисунок 1.14).

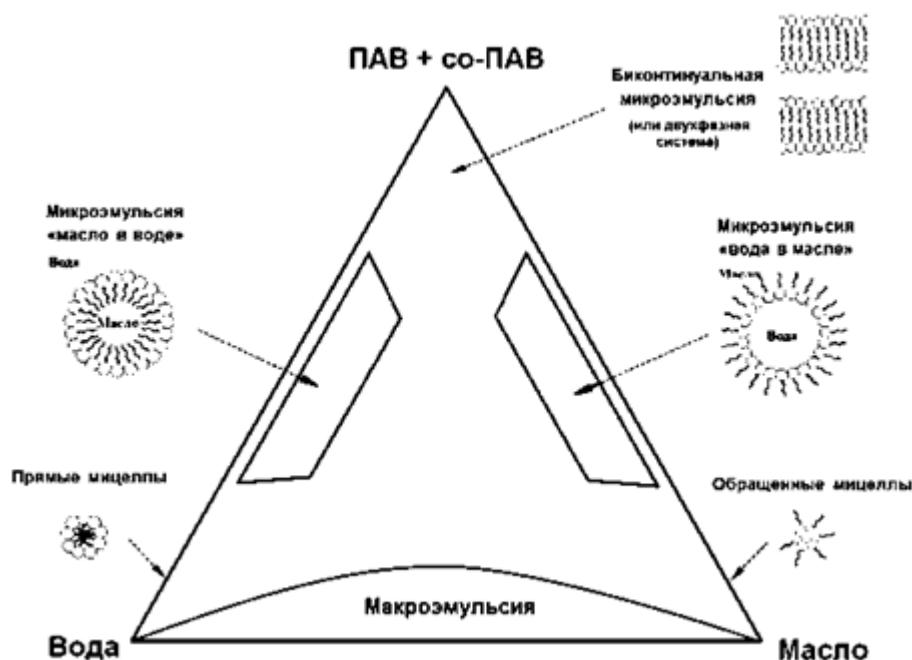


Рисунок 1.14 – Диаграмма фазового состояния трехкомпонентного дисперсного образования

Угловые значения диаграммы (рисунок 1.14) соответствуют максимальной концентрации каждого компонента (вода, ПАВ, масло). При такой структуре могут присутствовать мицеллярные системы с различными формами мицелл, жидкокристаллические фазы, обратные или упорядоченные сферы цилиндра или ламеллярные мицеллы [116, 135, 227]. Специфические формы фаз характерны при использовании неионогенных ПАВ с большими полярными и неполярными молекулярными участками. Чаще всего это происходит при введении в систему дополнительного компонента – со-ПАВ. В этом случае необходимо построить четырехкомпонентную диаграмму состояний с указанием специфичности состава ПАВ (ионогенные и неионогенные) [108, 115, 116, 135, 147, 182, 227].

Исходя из основных свойств жидкости [108, 116, 135] выделяют три типа эмульсий (рисунок 1.15).

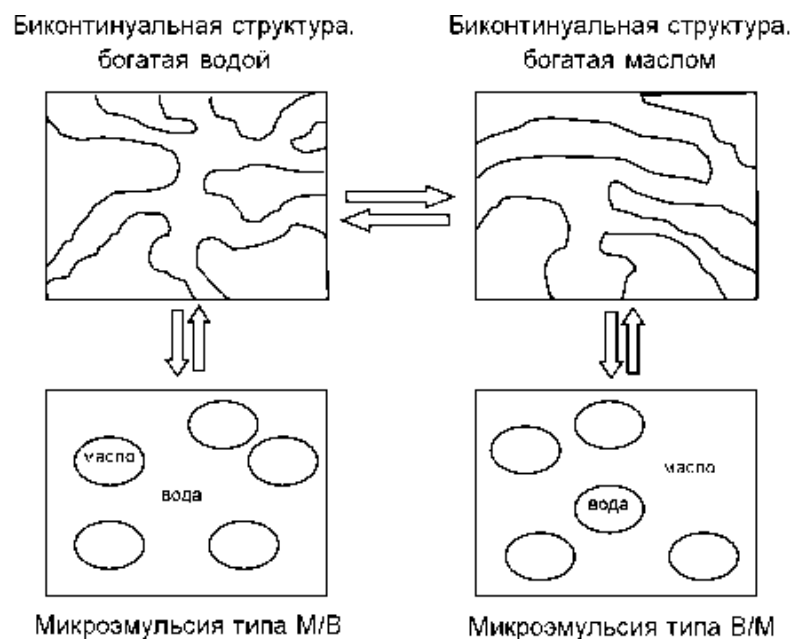


Рисунок 1.15 – Дисперсные образования типа вода–масло и масло–вода

Классический тип эмульгированного образования гидролизатов типа вода–масло представляется в виде микрокапель масла, находящихся по всему объему водной среды, с сильно искривленным межфазным поверхностным натяжением в сторону масла (рисунок 1.15). Обратная эмульсия типа масло – вода, представляет собой микрокапли воды, находящиеся во взвешенном состоянии в неполярной органической фазе, соответственно искривление межфазной поверхности происходит в сторону воды. И третий тип – биконтинуальная эмульсия, в которой динамически переплетенные структуры воды и масла стабилизированы ПАВ на границе раздела фаз со значительным коэффициентом диффузии при нулевом межфазовом искривлении. В данном случае диффузия ПАВ происходит гораздо быстрее [201, 202].

При повышении термических показателей или при добавлении к дисперсным образованиям электролитов наблюдается снижение стабилизирующих свойств молекул ПАВ с увеличением сходства по отношению к неполярной фазе. Тем самым снижается область расслоения углеводородной фазы по отношению к водной [22, 126, 206]. Зависимость поверхностного натяжения от границы раздела фаз в трехфазной системе гидролизата представлена на рисунке 1.16.

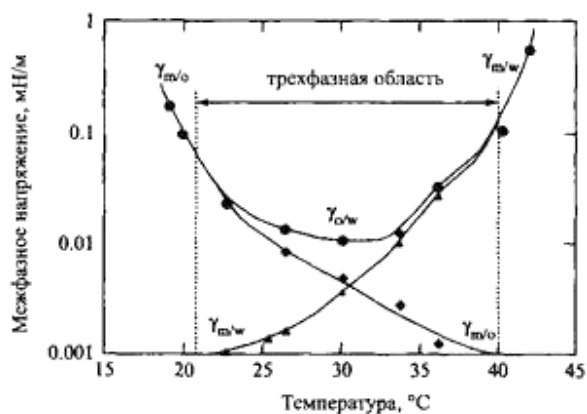


Рисунок 1.16 – Влияние температуры на межфазные натяжения в трехкомпонентной системе

Повышение температуры жидкого субстрата приводит к увеличению поверхностного натяжения в области расслоения и, соответственно, при понижении температуры поверхностное натяжение снижается (рисунок 1.16). Малое значение межфазового напряжения ведет к снижению влияния границ раздела фаз с последующей гомогенизацией [49]. При повышении температурных значений в дисперсных образованиях типа вода – масло межфазовое напряжение соответствует минимальным показателям, что связано с сольubilизацией полярных и неполярных фаз. Достижение точки минимального значения межфазного напряжения обуславливается диапазонами от 1×10^{-2} до 1×10^{-3} мН/м [190].

Главной составной частью любой эмульгированной системы гидролизата являются ПАВ, в состав которых входят ионогенные и неионогенные полярные группы с продолжительной углеводородной цепью. Классификация ПАВ основывается на заряде их полярных групп и природе их происхождения. Исходя из химического состава органические поверхностно-активные вещества с дифильным строением подразделяются на неионогенные, анионные, амфолитные и катионные [49, 190].

Значительное количество ПАВ, применяемых в пищевом производстве, – анионно-универсальные ПАВ. Их доля от общего объема соответствует 60 % и более, а оставшийся объем принадлежит неионогенным, катионным и синтетическим амфолитным ПАВ [134, 157, 172, 198]. К анионным ПАВ относят органические соединения – соли кислот, ароматические сульфокислоты, соли эфиров кислот. Катионные ПАВ включают в себя ароматические амины и соли пиридиновых оснований [140, 200, 204, 215, 224]. Неионогенные ПАВ включают некоторые эфиры жирных кислот, алкифенолы и глицериды [184]. Непосредственно белковые вещества и аминокислоты гидролизата относятся к амфолитным ПАВ [145, 165, 207, 209]. В некоторых случаях для

формирования эмульгированных систем используют конденсационные и диспергационные (механические, ультразвуковые, электрические) методы [100, 106, 121, 136, 158].

Агрегативная стойкость и молекулярная структурность короткоцепочечных АСВ гидролизата, обладающих поверхностно-активными свойствами, определяется электрохимическими взаимодействиями: аминокислоты, входящие в состав белков, могут образовывать ионы как с положительным, так и отрицательным зарядом, которые в свою очередь влияют на интенсивность электрохимических взаимодействий. Заряды аминокислот зависят от концентрации в растворе АСВ, рН и наличия посторонних примесей ионов минералов. При превалировании одного из зарядов происходит вытягивание молекулы белка [163, 164]. ПАВ с белковой основой, образовавшейся в гидролизатах, стабилизирует дисперсные образования, так как снижается избыточная поверхностная энергия с образованием прочной эмульгированной системы. Для белков, обладающих поверхностно-активными свойствами, характерно гидрофобное взаимодействие. Наибольшее количество липидов, которые могут входить в эмульсии, определяется концентрацией пептидов, обладающих выраженными поверхностно-активными свойствами, и степенью дисперсности системы. Пептиды будут характеризоваться адсорбцией липидов за счет гидрофобных остатков [108, 163].

Предполагается, что на разных стадиях протеолиза ПСО в качестве ПАВ служат боковые остатки в виде гидрофобных полипептидов определенной длины. На первой стадии протеолиза ПСО происходит преобладание пептидов с молекулярной массой $\approx 15\text{--}30$ кДа. Вторая стадия будет характеризоваться накоплением пептидов с молекулярной массой $5\text{--}15$ кДа, а также коротких олигопептидов с молекулярной массой не более $2,5\text{--}5,0$ кДа, которые, в свою очередь, являются хорошими эмульгаторами водно-жировой фракции. При этом растворимость большинства пептидов в воде обусловлена наличием на поверхности гидрофильных групп (гидроксильных, сульфгидрильных, амидных), принадлежащих полярным аминокислотам (серину, цистеину, аспарагину, глутамину и др.) и способных связывать воду, создавая стабильные эмульсии. Гидролизаты, полученные при продолжительном протеолизе ПСО, характеризуются накоплением пептидов с массой не более $2,5\text{--}5,0$ кДа и одновременным отсутствием молекул в нетрансформированной форме [50, 61, 100]

Опубликованные исследования показывают, что пептиды, способные образовывать стабильные эмульсии, в небольшом количестве (до $15\text{--}20$ %) переходят в бульон на первом этапе гидролиза. Увеличение продолжительности гидролиза приводит к снижению количества пептидов с молекулярной массой от 10 до 15 кДа, а дальнейший гидролиз

увеличивает концентрацию низкомолекулярных пептидов до 40 %, а на следующей стадии гидролиза концентрация эмульгирующих пептидов возрастает до 60–70 % и более. При этом ферментный препарат медленнее расщепляет труднодоступные белки ПСО. На последней стадии происходит снижение АСВ, обладающих поверхностно-активными свойствами, так как происходит протеолитическое разрушение ПАВ и параллельно – накопление короткоцепочечных АСВ, не влияющих на процессы формирования эмульсий. Если ФГ белкового субстрата проводить до предпоследней стадии, то образуются эмульсии, устойчивые к воздействию высоких температур, кислот и осаждению посредством центрифугирования, что, в свою очередь, увеличивает технологические издержки на дальнейшее концентрирование сухих веществ гидролизата. В белках гидрофобные взаимодействия возникают при нарастании неполярных гидрофильных остатков боковых цепей ряда низкомолекулярных пептидов, не контактирующих с водой [50,61,108, 136, 158].

Аналитический обзор научных данных показывает, что в качестве ПАВ гидролизатов могут выступать боковые остатки гидрофобных полипептидов – короткоцепочечные пептиды, то есть АСВ, несущие заряды и способные к образованию водородных связей. Отрицательно заряженные углероды не образуют водородных связей, и, следовательно, углеводородные цепи будут гидрофобными, тем самым они будут выталкивать молекулами воды. Наличие некоторых аминокислот (Ala, Trt, Ile, Phe, Tyr, Leu, Val) на концах белковой цепи способствует увеличению гидрофобного стремления АСВ, тем самым происходит сворачивание полипептидной цепи в клубок, внутри которого находятся гидрофобные полипептиды со связанными липидами, а на поверхности – гидрофильные группы [40, 100, 106, 121].

1.6 Биохимические особенности астаксантина в составе белкового гидролизата

Выделяемые астаксантиносодержащие белковые гидролизаты включают в себя каротинопротеиновые образования, встречающиеся в организмах животных, растений и грибов. Каротинопротеиновыми образованиями богаты представители ракообразных, такие как креветки [221], крабы [222], раки [184], омары [161]. Накопление и локализация каротинопротеинов происходит в хитино-минеральном матриксе ракообразных в частичной связи с липидами [216].

Главным каротиноидом ракообразных является астаксантин ($C_{40}H_{52}O_4$), однако были обнаружены другие – и лютеин, зеаксантин, β -каротин, но их количественное содержание в панцире ракообразных незначительно. Концентрация астаксантина по отношению к

другим каротиноидам варьируется от 75 до 98 %, в зависимости от его локализации (в панцире или внутренних органах) [216]. Массовая концентрация астаксантина в панцире ракообразных может варьироваться от 43 до 48 мкг/г. В небольшом объеме астаксантин локализуется в панцире некоторых наземных насекомых [170]. Накапливание астаксантина возможно и у некоторых морских и пресноводных рыб (среди пресноводных выделяются карповые) [138], что позволяет приобретать мышечным тканям красный оттенок [216].

Впервые кристаллы астаксантина были выделены в начале 1938 г. учеными Р. Кюном, Н.А. Соренсенем [162]. Астаксантин был извлечен из панцирей южных ракообразных, в честь чего и был назван соответствующий красящий пигмент. Пигменты экзоскелета концентрируются в различных цветовых видимостях клеточного слоя и в верхней эндокутикуле (пигментном слое), что напрямую влияет на цветовую дифференциацию ракообразных [161].

Распределение астаксантина у гидробионтов соответствует 63–98 % в покровном слое и 52–99 % – во внутренних тканях и органах [216]. В организме лососевых рыб до 66 % каротиноидов содержится в белково-липидном комплексе плазмы крови и до 34 % – в печени. Концентрация астаксантина зависит от рациона животного и среды обитания [187]. Многие рыбы способны накапливать астаксантин. Например, организм речной миноги способен накапливать астаксантин в зависимости от времен года и пола животного, при этом накопление осуществляется в разных частях организма. Присутствие астаксантина обуславливает розовый окрас перьев фламинго, алого ирбиса, розового пеликана [138]. Это объясняется рационом питания птиц – присутствием в нем большого количества ракообразных, что способствует накоплению астаксантина в организме птиц и приданию оперению розоватый оттенок [182].

Астаксантин находится в комплексе с определенными группами протеинов, каротинопротеинами. Группа каротиноидов в связи с протеинами представляет собой полипептиды, в пространственной структуре которых имеется полость с гидрофобной средой, что позволяет связываться обычными связями и растворять неполярные пигменты. Липидокаротиноиды представляют собой соединение липидных комплексов и каротиноидов без существенных изменений последних. Каротинопротеины представляют собой белковые комплексы со специфически связанными каротиноидами. Данные связи характеризуются значительным изменением спектральных свойств пигмента – гипсохромным сдвигом до максимума. Из-за большого количества апопротеиновых структур и происходит значительная цветовая дифференциация в организмах беспозвоночных [231]. Однако у беспозвоночных каротинопротеины представляют собой

белковые комплексы в связи с каротиноидами со строгим стереометрическим соотношением. В клеточном слое кутикулы астаксантин соединен с протеинами посредством стехиометрической связи в составе разветвленных мембран хроматофоров [225].

Образование связей между каротиноидами и различными комплексами (в том числе и белковыми) обуславливается батохромным сдвигом при максимальном поглощении, что делает пигмент более устойчивым к разрушению [125, 130, 225, 232, 231].

Астаксантин (3,3'-диокси-4,4'-диоксо- β -каротин) представляет собой кристалл красного цвета, относящийся к ксантофиллам, молярная масса которого соответствует 597 г/моль. Астаксантин имеет центрально-симметричную молекулу в виде пятиугольного углеводородного изопрена с восемью фрагментами (рисунок 1.17).

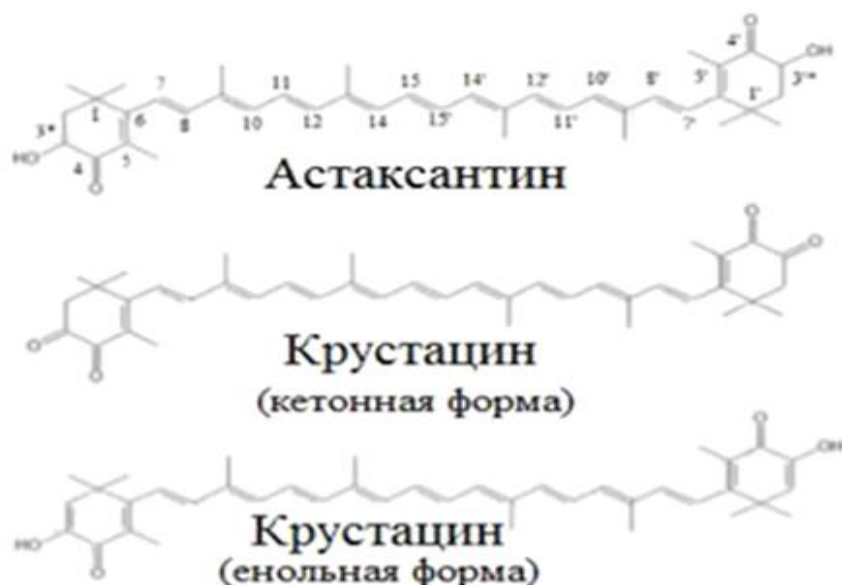


Рисунок 1.17 – Основные формы астаксантина

В центре молекулы астаксантина располагается неполярный фрагмент с системой π -сопряженных углерод-углеродных связей. Полярные фрагменты расположены с обоих концов полиеновой цепи и состоят из двух β -ионовых колец, где содержится по одной гидроксильной и кето группе. Соответственно, астаксантин состоит из двух энантиомерных и одной мезомерной формы, что и обуславливается разной степенью активности (рисунок 1.17) [199].

В живых системах вырабатывается преимущественно 3S,3'S-форма астаксантина, что зависит в первую очередь от концентрации того или иного состояния астаксантина и рационально-видовыми особенностями организма ракообразных [174]. В некоторых случаях определения астаксантина оптические изомеры могут быть фракционированы методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием различных видов кислот (например, камфорной) (рисунок 1.18 А, Б) [159].

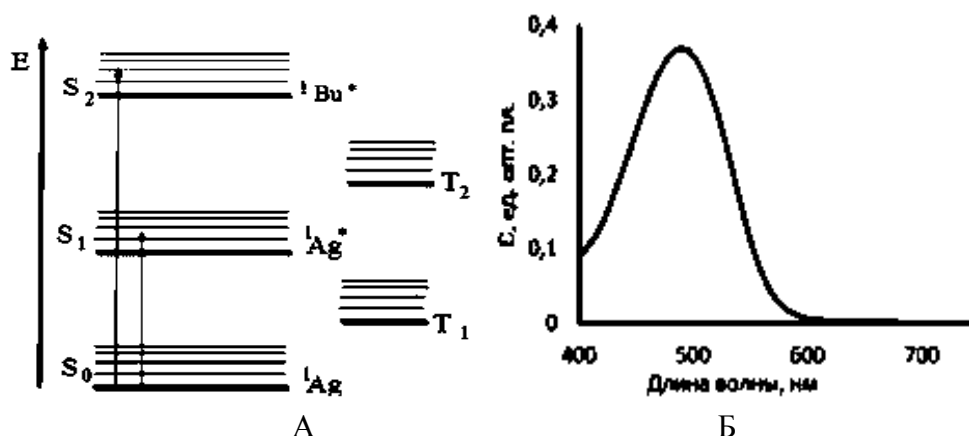


Рисунок 1.18 – Показатели астаксантина: А – энергетические значения астаксантина, Б – спектральная зависимость астаксантина

В естественной среде значительная часть астаксантина находится в виде all-транс-формы и в меньшей части – в виде геометрических изомеров [133]. Геометрические изомеры отличаются от других в первую очередь различными спектрами поглощения энергии – квантово-химическим значением [187]. Использование ткани рыб лососевых пород и методики абсорбционной спектроскопии позволило установить различное соотношение форм астаксантина в мышечной ткани и внутренними органами рыб и ракообразных, в том числе и в ПСО, где преобладающая форма астаксантина ПСО находилась в цис-форме [187].

При наличии удлинённых гидрофобных молекул данный каротиноид растворим в неполярных растворителях. При обычных условиях (температуры и давления) растворимость молекулы астаксантина в ацетоне составляет 967 мкг/г, в гексане – 69 мкг/г, в хлороформе – 33 мкг/г, что важно при определении концентрации астаксантина в исследуемом субстрате. Если в среде увеличивается доля полярных компонентов, то растворимость молекул астаксантина снижается, что может повлиять на гидрофобные взаимодействия молекул и привести к образованию так называемых Н-агрегатов, характеризующихся значительной степенью упорядоченности [143]. При незначительной доли полярных компонентов в растворителе образуются J-формы с низкой степенью упорядоченности [167]. В водной среде растворимость астаксантина составляет не более 0,03 мкг/г, однако он способен включаться в структуру липосом и полимерных частиц, увеличивая растворимость и стабильность системы (рисунок 1.19) [197].

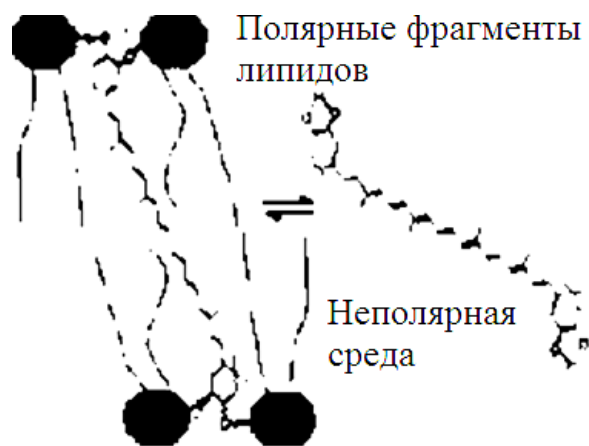


Рисунок 1.19 – Взаимодействие астаксантина с молекулами липидов

Расположение астаксантина на низких энергетических уровнях обуславливается его спектральными и оптико-химическими свойствами. Поглощение энергии астаксантином происходит за счет смены энергетического состояния на возбужденное, с последующим переходом с π -электрона на π' -орбитали (рисунок 1.19). В системе сопряженных степеней делокация π -электронов высока, что создает отличия между различными орбитами, так как сопряженные связи астаксантина длиннее по сравнению с большинством каротиноидов [225.].

Спектральный анализ астаксантина показывает его концентрацию в исследуемом образце. В некоторых случаях при поглощении спектра схожими каротиноидами (канта- и родоксантина) фиксируются схожие длины волн, что может быть причиной неточного качественного и количественного определения каротиноидов в изучаемом субстрате [225].

Астаксантин может участвовать в значительных спектральных реакциях (фотохимических и фотоизомеризационных) [219]. При этом антиоксидантные свойства астаксантина позволяют ему в значительной мере концентрироваться на окисляемом веществе, тем самым предотвращая или замедляя окислительные реакции [141]. Присутствие астаксантина в гомогенизированном субстрате замедляет окислительные процессы липидов, что, несомненно, важно, при выделении БГ из ПСО с последующим обезвоживанием и хранением БГ как в чистом виде, так и в составе комбинированных продуктов.

Выраженное воздействие антиоксидантного эффекта астаксантина на липосомы связывается с особенностями формирования свободных радикалов и их нейтрализацией астаксантином. Это возможно за счет двухфазного значения перекисного окисления липидов: первая фаза обуславливается формированием активных форм кислорода с последующей его диффузией в липидный слой во второй фазе [148,149, 160]. Ионные кольца астаксантина нейтрализуют активные формы кислорода, не пропуская их в

мембраны липидов, что и препятствует окислению, а при нейтрализации свободных радикалов происходит погружение молекул астаксантина в толщу липидных мембран с последующим изменением полиеновых цепей. Потребление от 2 до 4,5 мг астаксантина в сутки в составе белковых масс улучшает работу мочеполовой системы, снижает избыточное кровяное давление, улучшает работу сердечно-сосудистой системы, а также усиливает свойства витамина Е и С [148, 149].

Еще одним свойством астаксантина является возможность образовывать внутримолекулярные водородные связи при взаимодействии с гидрокислыми кетогруппами β -иононовых колец. Данная особенность позволяет полностью погружаться в неполярную среду с последующей нейтрализацией синглетного кислорода [141]. Присутствие астаксантина в составе БГ влияет на структурные свойства мембран (вязкость), позволяя изменять диффузионное взаимодействие липидов, а при воздействии высоких температур – предотвращать дезорганизацию липидов [193].

Хранение астаксантина предпочтительно осуществлять в составе жидких липидов растительного происхождения, это необходимо для увеличения стабильности астаксантина даже при комнатной температуре в течение нескольких месяцев. Липидные комплексы растительной природы (пальмовое, оливковое, горчичное, подсолнечное, рисовое масло) также позволяют повышать термическую стойкость астаксантина до 90 °С в течение восьми часов, что связано с особенностями состава жирных кислот (наличие токоферолов, флавоноидов, оризанола) [138]. Извлеченный из ПСО астаксантин в составе БГ чувствителен к ультрафиолетовому излучению, вследствие чего для избежания его деструктивных изменений хранение необходимо осуществлять в помещении с минимальным освещением.

При экстракции БГ из панцирных отходов ракообразных необходимо учитывать, что часть астаксантина этерифицирована с жирными кислотами и протеинами, а часть находится в виде диэфиров, моноэфиров или в свободных формах. При извлечении астаксантиносодержащего сырья из ПСО органическими растворителями локализация астаксантина в связи с белками будет высока, однако происходит частичное разрушение связей между пигментом и белково-липидными комплексами, что в дальнейшем может повлиять на термостабильность и хранимостпособность астаксантина [210].

Технология извлечения БГ из панцирей ракообразных может основываться на экстракции водой, слабыми растворами соляной кислоты или на протеолизе (гидролизе), а осаждение из жидкого гидролизата может производиться с использованием сульфата аммония. Технология извлечения БГ из отходов ракообразных посредством протеолиза ПСО (при помощи трипсина, химотрипсина, пепсина, папаина), предложенная учеными

Б.К. Симпсоном в 1985 г., К. Лопесом – 1987 г. и В. Чакрабартом – 2002 г., является хорошей альтернативой химическим способам выделения, как в чистом виде, так и в составе белково-липидных комплексах [210].

Исследуемое в диссертационной работе сырье прошло первичную тепловую обработку, при этом определено, что на начальном этапе гидролиза сохраняется мембранная целостность липидного и протеинового комплекса при связи с молекулами астаксантина [142].

При разработке технологии переработки ПСО необходимо учитывать, что при контакте с кислородом астаксантин разрушается до астацина (преобразуется в енольную форму) [127]. При использовании восстанавливающих агентов (например, боргидрида натрия) молекулы астаксантина можно восстановить до гидрокислых групп с образованием крустаксантина, что при взаимодействии с карбоновыми кислотами позволяет образовывать сложные эфиры, однако антиоксидантная активность восстановленного каротиноида в конечном продукте будет меньше. Важно учитывать, что астаксантин в чистом виде неустойчив при температуре в 65 °С, однако в связи с белково-липидным комплексом пигмент приобретает небольшую термостойкость и может сохранять искомую структуру при непродолжительных температурах инактивации протеазы выделенной плотной фракции [210].

Научные данные о физико-химических свойствах астаксантина в составе белковых гидролизатов свидетельствуют о том, что ферментативный гидролиз ПСО является наиболее приемлемым способом, так как он позволяет извлекать значительную часть сухих веществ, в том числе и астаксантин, а инактивация ПГЗх происходит раньше, чем достигается критическое значение термостойкости астаксантина, связанного с протеином / липидами. Однако существующие технологии переработки ПСО производят конечный белковый гидролизат с высокой жирностью, что, в свою очередь, снижает возможности дальнейшего его использования в качестве пищевого продукта или пищевого ингредиента, в том числе и для производства продуктов, обладающих антиоксидантными свойствами.

1.7 Практические аспекты применения белкового гидролизата в производстве пищевых продуктов

Современные направления развития пищевой индустрии направлены в первую очередь на обеспечение населения сбалансированным питанием. Одним из путей решения поставленных задач являются разработка и внедрение инновационных технологий

выработки пищевых продуктов с заданными свойствами [6, 35, 66, 123]. Данный тип продукта имеет целенаправленное воздействие на организм человека, а также может включать в себя основные или второстепенные биологически ценные компоненты (пробиотики, синбиотики, пребиотики), имеющие специфические или точечные воздействия на организм человека [128]. К основным свойствам такого продукта относят: пищевую ценность, целенаправленное физиологическое воздействие на организм, антиоксидантную активность, профилактику различных заболеваний, вкусоароматические показатели и так далее [38, 71, 153]. Современное производство продуктов с заданными пищевыми свойствами основывается на использовании биологически активных добавок или ингредиентов. Пищевой ингредиент (основной или второстепенный) может включать в себя разнообразные биологически ценные вещества (антиоксиданты, определенные группы аминокислот, витамины, каротиноиды, минеральные вещества) [29, 31, 117, 168, 223]. При создании продуктов с заданными свойствами рекомендуется использовать сухие белковые гидролизаты животного происхождения, полученные в результате переработки малоценного, некондиционного сырья или белково-минеральных отходов (панцири ракообразных, чешую рыб). Данное решение позволит получить конечный продукт высокой биологической ценности, усвояемости и себестоимости.

Важно учитывать, что сухие белковые гидролизаты, помимо высокой биологической ценности, могут дополнительно обладать коллоидно-химическими свойствами (КХС). К КХС относят: вязкость [131], способность к эмульгированию, гелеобразованию и растворимость [19, 94, 110, 208, 226]. КХС зависят от степени гидролиза, то есть от длины пептидных цепей и количества ионизированных групп. Для таких продуктов рекомендуется применять белковые комплексы с массой пептидов от 5 до 15 кДа [43, 114, 133]. При этом необходимо максимально сохранять в составе белковых гидролизатов дополнительные биологически ценные компоненты (жирорастворимые витамины, каротиноиды и, в частности, астаксантин) [124].

Однако некоторые компоненты (например, астаксантин), входящие в состав выделяемых белковых гидролизатов, нестабильны при продолжительном воздействии кислорода или высокой температуры, что, в свою очередь, накладывает определенные ограничения, связанные с конечной структурообразующей обработкой продукта.

Для сохранения необходимой концентрации биологически ценных компонентов (астаксантина) необходимо отказаться от стандартной технологии, включающей классическую сушку и / или термообработку. Решение существующей проблемы возможно при введении в технологический процесс нестандартных или комбинированных методов обработки пищевого продукта, например, вакуумной сушки. Данное решение

повышает производственные затраты на выработку продукта, однако позволит сохранить необходимую концентрацию астаксантина. При использовании вакуумной сушки на этапе структурообразования конечного продукта необходимо не преодолевать гигроскопического значения в целях сохранения определенной структурной прочности конечного изделия [7, 13, 44].

Современные тенденции производства продуктов питания с заданными свойствами ориентированы в первую очередь на многокомпонентный и сложный состав. Использование пищевых белковых гидролизатов в комбинации с растительным сырьем обогащает конечный продукт дополнительными аминокислотами, витаминами и веществами (токоферолами, флавоноидами и изофлавоноидами), повышающими стойкость астаксантина при хранении. Применение растительного сырья при выработке комбинированного продукта также позволяет достигать желаемых технологических свойств и приемлемой вкусоароматической композиции [17, 45].

При проектировании комбинированного рыборастворительного продукта ряд отечественных и зарубежных авторов рекомендуют использовать растительные основы некоторых бобовых культур [17, 66]. Подобная тенденция объясняется сочетаемостью основных компонентов растительного сырья (эфирных масел, фосфолипидов и углеводов) с белковыми гидролизатами, выделенными из ПСО, что, в свою очередь, способствует улучшению органолептических характеристик в конечном продукте.

Применение бобовых в производстве комбинированных рыборастворительных продуктов также обуславливается значительным содержанием в них полноценного белка и сложных углеводов (таблица 1.7). Липидная составляющая сырья также представлена в виде омега-3 и омега-6 кислот.

В бобовом сырье также присутствуют флавоноиды / изофлавоноиды (до 30–40 мг/кг сухого веса), что может положительно повлиять на хранимоспособность астаксантина в конечном продукте. В рассматриваемом растительном сырье может содержаться до 150 видов флавоноидов / изофлавоноидов, основными из которых по концентрации являются нарингенин, антоцианин, физетин, ритин, дигидроквертиин, байкалеин и другие.

Таблица 1.7 – Химический состав растительного сырья¹

Показатели	Содержания веществ в сухом растительном сырье, %			
	Чечевица зеленая	Фасоль (белая и красная)	Горох	Рапс
Белок, не менее	23,0 – 25,1	20,2 – 22,1	19,2 – 21,3	25,2 – 27,4
Липиды, не более	1,6 – 2,1	1,0 – 1,6	1,6 – 1,9	40,2 – 46,3
Зола	2,6 – 2,8	3,5 – 3,7	2,6 – 2,9	3,7 – 5,6
Углеводы, всего	68,9 – 72,8	72,6 – 75,3	73,9 – 76,6	20,7 – 30,9
в том числе клетчатка	5,6 – 8,6	5,8 – 8,0	5,8 – 8,1	4,6 – 6,1

¹ – справочник «Химический состав российских пищевых продуктов»

Для производства образцов комбинированного продукта будет использована чечевица зеленая и два вида фасоли (белая и красная), так как содержание белка в них выше (таблица 1.7). Использование рапса нецелесообразно, так как высокое содержание липидов может негативно повлиять на органолептические показатели и хранимоспособность конечного продукта. Предполагается, что проектируемый продукт будет характеризоваться значительным содержанием белка, астаксантина при концентрации жира – не более 2,8 % и будет представлен в виде снековой продукции (снеков).

Снеки – (англ. Snack – легкая закуска) структурированные продукты пищевого назначения, состоящие из одного или нескольких компонентов с низким содержанием воды, сформированные в виде в небольшой круглой пластины и предназначенные для утоления голода между основными приемами пищи. К разновидностям снеков также относятся чипсы и крипсы.

Производство снеков является быстрорастущим сегментом пищевой промышленности, так как в качестве основного компонента рецептуры все чаще используется малоценное сырье или сырье, полученное в результате переработки ВБР. Снеки имеют низкое содержание воды (не более 10 %), что позволяет им быть значительным источником протеина, минеральных веществ, витаминов, также сложных углеводов.

Заключение по обзору литературы

Аналитический обзор научно-технической литературы показывает, что для обеспечения населения пищевыми продуктами, обладающими заданными свойствами, необходимо повышать уровень переработки ВБР. К рассматриваемому альтернативному сырью для получения новых видов продуктов, содержащих астаксантин, также относятся и панцирьсодержащие отходы ракообразных. Однако внедренные технологии переработки ПСО не подразумевают получение белковых гидролизатов, обогащенных астаксантином.

Предлагаемые на сегодняшний день решения в области получения из ПСО белковых пищевых гидролизатов предполагают использование достаточно дорогостоящих ферментов, при этом конечный продукт будет характеризоваться низким содержанием астаксантина.

Применение научно обоснованного режима частичного гидролиза с использованием относительно недорогих протеиназ микробного происхождения и комбинированного метода осаждения и обезвоживания выделяемых компонентов позволит получить белковый гидролизат (частично гидролизованный продукт), состоящий из каротинопротеинов, пептидов, липидов (в меньшей степени), астаксантина и минеральных веществ. Полученный таким образом обезвоженный белковый гидролизат будет использован в качестве основного компонента технологии производства комбинированных рыборастворительных снеков, содержащих астаксантин.

2 ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Методика постановки эксперимента

Постановка и проведение экспериментальной части диссертационных исследований осуществлялось на базе лабораторий кафедры Калининградского государственного технического университета, лабораторий испытательного центра Атлантического научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии, лабораторий химико-технологических исследований Атлантического научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии, центра испытаний и исследований санитарно-технологической пищевой лаборатории, а также Калининградской межобластной ветеринарной лаборатории.

Структура исследовательской программы представлена на схеме (рисунок 2.1). Основные положения постановки экспериментальной части включали:

1) Организацию эксперимента с целью выявления научно обоснованных методов извлечения пищевого белкового гидролизата из ПСО, посредством ферментативного гидролиза. Подтверждение выдвинутых в теоретической части гипотез и предположений, связанных с увеличением степени извлечения БГ из ПСО при минимальных потерях белка и астаксантина в составе эмульсий с учетом рационально подобранных параметров ферментативного гидролиза.

2) Разработку технологии комбинированных снеков с последующей органолептической, химической и биологической градацией полученного продукта и обоснованием сроков годности.

3) Разработка соответствующей технической документации, а также получение патента на предлагаемый способ производства.

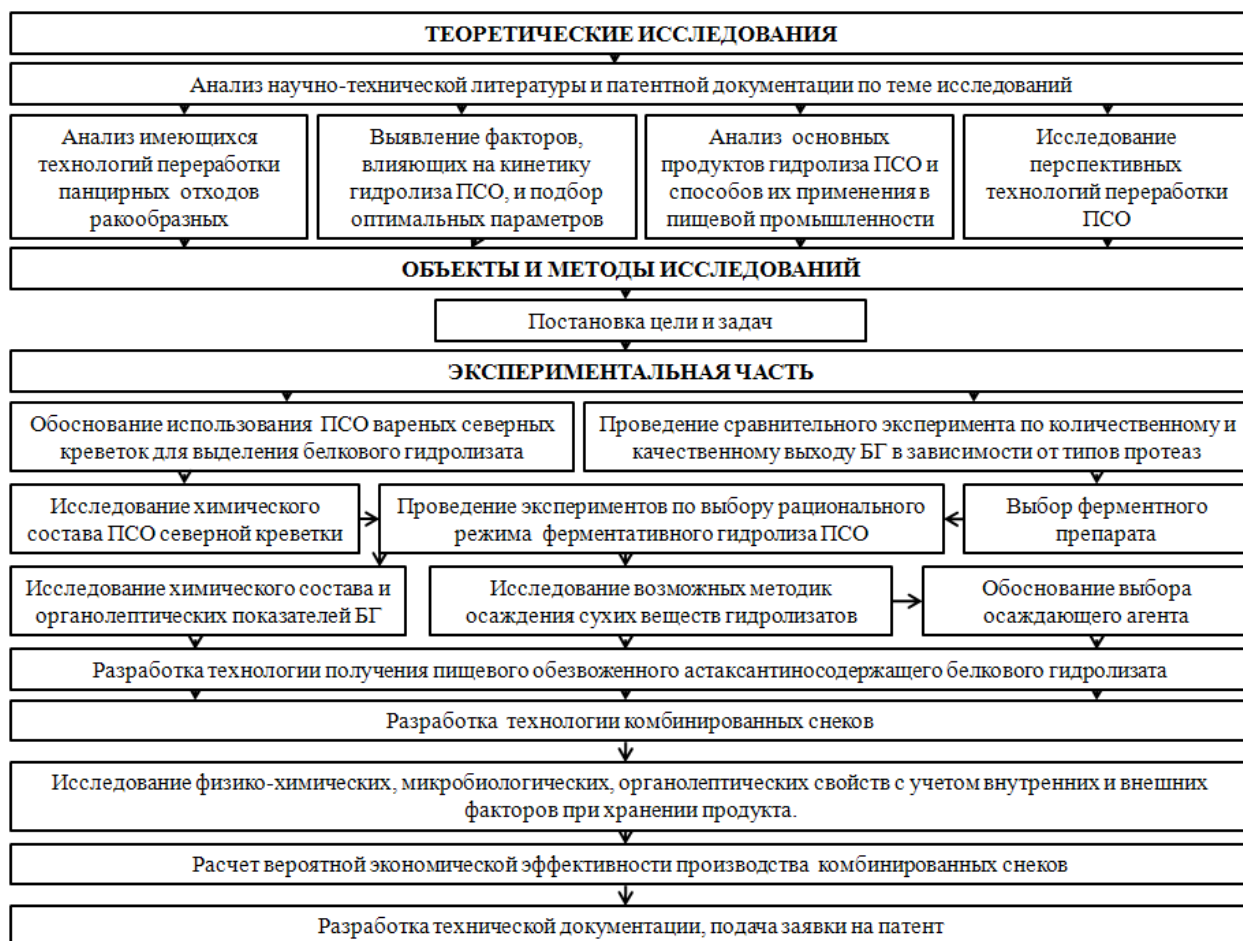


Рисунок 2.1 – Структурная схема исследовательской работы

В качестве электронных средств фиксации и контроля получаемых результатов использовались компьютерные программы Hotviewer, Microsoft Office 2012/2007 и Digital Microscope.

2.2 Характеристика исследуемого сырья

Объектами исследования являлись механическая и ферментативная обработка ПСО, процессы осаждения продуктов гидролиза ПСО различными агентами, вакуумное обезвоживание получаемых осадков, а также целевого белкового гидролизата. В качестве сырья использовались варено-мороженые панцирьсодержащие отходы северной креветки – панцири головогруды, абдомена и конечности (ТУ 10.20.31–296–00472093–2018). Для ферментативного гидролиза ПСО использовался протосубтилин Г3х 120 ед/мг (ПГ3х) (ГОСТ 23636-90), трипсин 1100 ед/мг (EINECS232-629-3, КАС 9001-75-6 производитель Salus NUTRA INS) и химотрипсин 1200 ед/мг (EINECS232-650-8, ISO 9001 производитель Salus NUTRA INS)). В качестве растительного ингредиента использовалась сушеная

зеленая чечевица (ГОСТ 7066-77), красная и белая фасоли (ГОСТ 7758-75). Для приготовления раствора хитозана использовался хитозан (молекулярная масса 1526,45 г/моль поставщик ООО «ВИРУД РУС») и щавелевая кислота (ГОСТ 22180-76). Для приготовления раствора использовалось 0,5 г хитозана для 1 кг декантированного гидролизата, разведенного в соотношении 1:4 в растворе воды и щавелевой кислоты (из расчета 1,59 мг на 1,0 г воды) с рН 5,0 – 5,5.

2.3 Методы физико-химических исследований

Определение концентрации азотистых веществ (ГОСТ 7636-85) осуществлялось посредством использования дистилляционной установки, снабженной автоматическим титратором и средством представления данных. В качестве среды, связующей азот, отгоняемый из соли сернокислого аммония нейтрализованной щелочью, использовалась однопроцентная борная кислота с индикаторами бромкрезоловый зеленый и метиловый красный. Титрование осуществлялось с использованием 0,1 н раствора соляной кислоты. Содержание белка в 1 г образца (в случае ПСО количество белка определялось расчетно-аналитическим методом с учетом количества хитина) определялось по формуле 2.1:

$$Б = \frac{ОА \times 6,25}{n} \times 100, \quad (2.1)$$

где n – навеска веществ, г;

где n – навеска веществ, г;

6,25 – коэффициент пересчета;

ОА – общий азот, мг.

Определение количества протеинов производилось с учетом соответствующего коэффициента перерасчета азота на белок – 6,25.

Методика определения небелкового азота (НБА) основана на осаждении белков трихлоруксусной кислотой.

Небелковый азот определяется по формуле 2.2:

$$НБА = \frac{2 \times a \times K \times 0,028 \times V}{m \times V_1} \times 100, \quad (2.2)$$

где 2 – коэффициент, учитывающий разведение вытяжки трихлоруксусной кислотой;

a – количество определенного азота, мл;

K – поправочный коэффициент;

0,028 – количество азота, эквивалентное 1 мл 0,02 нормальности раствора щелочи, мг;

V – объем колбы разведения, мл;

V_1 – объем фильтрата, взятый для минерализации, мл;

m – масса навески, г.

Массовую долю аминного азота (формольно–титруемого азота) определяли методом формольного титрования по ГОСТ 7636-85. Метод основан на связывании аминогрупп с формалином и косвенном определении их количества по результатам титрования карбоксильных групп. Содержание формольно-титруемого азота (аминного азота) в мг на 100 г продукта определяют по формуле 2.3:

$$\text{ФТА} = \frac{(a-b-c) \times K \times 1,4 \times V}{m \times V_1}, \quad (2.3)$$

где a – количество щелочи, использованной для титрования первой колбы, мл;

b – количество щелочи, использованной для титрования второй колбы, мл;

c – количество щелочи, использованной для титрования третьей колбы, мл;

K – поправочный коэффициент для 0,1 н раствора щелочи;

1,4 – количество азота, эквивалентное 1 мл 0,02 нормальности раствора щелочи, мг;

V – объем колбы разведения, мл;

V_1 – объем фильтрата, взятый на титрование;

m – масса навески, г.

Степень гидролиза (СГ) белка оценивалась по изменению формольно-титруемого азота (ФТА) в растворимой фракции и негидролизованном субстрате:

$$X = \frac{\text{ФТА}_2 - \text{ФТА}_1}{\text{ОА} - \text{ФТА}_1} \times 100, \quad (2.4)$$

где ФТА_1 – азот концевых аминогрупп в начале эксперимента;

ФТА_2 – азот концевых аминогрупп на завершающем этапе эксперимента;

ОА – количественное значение общего азота, мг на 100 г;

Определение аминокислотного состава в обезвоженном белковом гидролизате и в снеках осуществлялось посредством капиллярного электрофореза по методике М-03-38-2009.

Процентное соотношение липидов в исследуемых образцах определялось по ГОСТ 7636-85. Технология основана на использовании органических растворителей с

последующим удалением жидкости и взвешиванием липидов. Отбор проб осуществлялся по ГОСТ 31339-2006, измельчение образцов проводилось механическим способом. Измельченные образцы подвергались обезвоживанию при температуре 105 °С.

Установление массового значения липидов в исследуемых образцах определялось по формуле 2.5:

$$X = \frac{(M_2 - M_1) \times 100}{M \times (100 - W)}, \quad (2.5)$$

где M – массовое значение пробы, г;

M_1 – весовое значение пустой колбы, г;

M_2 – масса колбы с жиром, г;

W – массовая доля воды в испытуемой пробе, %.

Астаксантин выделялся посредством экстракции и перевода его в органический растворитель. Для этого измельченное сырье несколько раз настаивалось в ацетоне и центрифугировалось до полного разделения на плотную и жидкую части. Для полного выделения астаксантина цикл повторялся три раза. Из раствора ацетона астаксантин реэкстрагировался петролейным эфиром, который полностью удалялся посредством высушивания при температуре не более 30 °С без прямого воздействия света, при минимальной конвекции воздуха.

Получаемые после удаления петролейного эфира оставшиеся каротиноиды растворялись в 250 мл хлороформа, после чего определялось их количественное содержание методом спектрофотометрии на фотоэлектроколориметре (ФЭК) модели 2МК. Метод основан на свойствах каротиноидов (астаксантина) соответствовать определенным максимумам поглощения в ультрафиолетовом спектре. Длина волны, соответствующая максимальному поглощению, определяется природой астаксантина и свойствами растворителя. Астаксантин, растворенный в хлороформе, имеет максимум поглощения при длине волны 490 нм.

Содержание астаксантина (мкг/г) определялось по формуле 2.6:

$$C = \frac{D \times V \times 100}{250 \times m}, \quad (2.6)$$

где D – оптическая плотность раствора в хлороформе при длине волны 490 нм;

V – объем бинарной смеси, мл;

m – масса навески, г.

Для установления механизма, отображающего характер проводимого гидролиза в аспекте превалирования диффузионного или кинетического влияния, использовалось топохимическое уравнение Аврами-Колмогорова-Ерофеева (2.7 и 2.7.1):

$$\ln F = \ln K + n \times \ln t, \quad (2.7)$$

где F – коэффициент, характеризующий степень конверсии субстрата ($F = -\ln(1-\alpha)$)

α – степень конверсии;

K – коэффициент, зависящий от скорости;

t – продолжительность гидролиза, мин;

n – кинетический параметр, характеризующий механизмы процесса.

$$\alpha = \frac{C_t}{C_0}, \quad (2.7.1)$$

где C_t – концентрация белка в течение определенной продолжительности гидролиза t ;

C_0 – максимальная концентрация белка.

Определение протеолитической активности, проявляемой ПГЗх в процессе инактивации, основано на изучении скорости накопления азота концевых ФТА в процессе тепловой инактивации (2.8):

$$v = \frac{\text{ФТА}_t - \text{ФТА}_{t-1}}{\text{ОА}} \times 100\%, \quad (2.8)$$

где v – скорость накопления ФТА, %;

ФТА_t – значение азота концевых аминогрупп при определенной продолжительности t ;

ФТА_{t-1} – предыдущее значение азота концевых аминогрупп;

Для более точного определения динамики активности фермента проводилось трехкратное повторение эксперимента.

Определение золы в исследуемых образцах производилось по средством ГОСТ 7636-85. Метод основан на удалении воды, с последующим сжиганием высушенной навески при температурных значениях в 300 °С и в 500–600 °С. Полученные образцы подвергались взвешиванию.

Вычисление процентного значения золы в исследуемых образцах производилось по формуле 2.9:

$$x = \frac{(G - G_1) \times 100}{g}, \quad (2.9)$$

где G – массовое значение тигли с золой, г;

G_1 – массовое значение пустой тигли, г;

g – масса навески, г.

Массовая доля воды определялась по ГОСТ 7636-85. Сущность метода заключается в высушивании образцов до постоянной массы при температуре 100–105 °С в течение не менее 180 мин.

Определение водородного показателя (рН) в исследуемых образцах осуществлялось посредством использования прибора TESTO 206–рН2 по ГОСТ 3377-2016. Калибровка прибора осуществлялась при помощи комплектованных буферных растворов. Исследуемые образцы предварительно подвергались измельчению (при необходимости), с последующим внесением и настаиванием в водном дистилляте. Погрешность измерения составила менее 1%.

Содержание доли хитина (в %) определялось по ГОСТ 7636-85. Метод включал многоступенчатое удаление биологических молекул концентрированным щелочным раствором с последующей деминерализацией панциря раствором соляной кислоты. После чего образец промывался водой, высушивался и взвешивался.

Процент хитина в сырье вычислялся по формуле 2.10:

$$H = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%, \quad (2.10)$$

где H – количественное значение хитина, %;

m_1 – масса образца в начале эксперимента, г;

m_2 – масса образца в конце эксперимента, г.

Содержание углеводов в снеках определялось согласно ГОСТ 5903-89.

2.4 Методика органолептических исследований

Органолептические исследования проводились по ГОСТ 7631. Оценка проводилась в зависимости от проявления органолептических показателей и их интенсивности. Результаты оценок дифференцировались по пятибалльным значениям и выражались в виде графических профилей – профиллограмм и диаграмм. Эксперты дегустационной комиссии и помещения, где проводились дегустации, соответствовали требованиям ГОСТ ISO 13299 – 2015.

Определение оптических показателей исследуемых образцов осуществлялось с помощью микроскопа МБС-1 с 32-кратным увеличением. Для получения более точных

данных о состоянии гидролизированных компонентов сырья использовался электронный микроскоп U1600X с портативной станцией наблюдения, обладающей 500-кратным увеличением. Оптические измерения проводились на основных этапах эксперимента.

2.5 Определение микробиологических показателей и токсичных элементов

Первоначальный отбор проб для микробиологических исследований осуществлялся по следующим стандартам: ГОСТ 31339-2006, ГОСТ 26668, ГОСТ 7631, ГОСТ 26929, ГОСТ 26669. Для определения микробиологических значений исследуемого сырья использовались следующие стандарты: ГОСТ 31746 п.4.1.1, ГОСТ 31659, ГОСТ 29185 п.4.2, ГОСТ 31747 п.4.2, ГОСТ 10444.15–94, ГОСТ Р 52816–07, ГОСТ 10444.12–2013, ГОСТ 29185-2014, ГОСТ 30726-2001.

Определение токсичных элементов и тяжелых металлов осуществлялось по ГОСТ EN 14083-2013, ГОСТ 31707-2012 (EN 14627:2005), ГОСТ Р 53183-2008, ГОСТ EN 14083-2013, ГОСТ 32163-2013 и ГОСТ 32161-2013.

2.6 Определение потенциальной биологической ценности белка

Определение аминокислотного сора по основным НАК проводилось по формуле 2.11:

$$C = \frac{A_i}{АСК_{\text{эталона}}}, \quad (2.11)$$

где С – аминоскор, %;

A_i – содержание НАК в белковом компоненте готового продукта, г/100 г белка;

$АСК_{\text{эталона}}$ – содержание той же НАК в эталонном белке FAO/WHO, г/100 г белка (2015).

Определение коэффициента различия аминокислотного сора (КРАС) проводилось по формуле 2.12

$$КРАС = \frac{(C - 100)}{8}, \quad (2.12)$$

Потенциальная биологическая ценность (БЦ) белка вычисляется по формуле 2.13.

$$БЦ = 100 - КРАС, \quad (2.13)$$

Коэффициент утилитарности аминокислотного состава (U) вычисляется по формуле 2.14.

$$U = \frac{\sum_{i=1}^n (AK_i \times a_i)}{\sum_{i=1}^n AK_i}, \quad (2.14)$$

где AK_i – содержание каждой незаменимой аминокислоты в 100 г исследуемого белка;
 a_i – коэффициент утилитарности незаменимой аминокислоты, ед (формула 2.15).

$$a_i = \frac{AC_{min}}{AC_i}, \quad (2.15)$$

где AC_{min} – минимальный из скоров незаменимых аминокислот в исследуемом белке, %
 Коэффициент сопоставимой избыточности (σ_n) вычисляется по формуле 2.16.

$$\sigma_n = \frac{\sum_{i=1}^n (AK_i - AC_{min} \times AK_{i \text{ ст}})}{AC_{min}}, \quad (2.16)$$

2.7 Оценка экономической эффективности технологии комбинированных снеков

Основными определяемыми показателями являлись себестоимость 1 кг комбинированных снеков, оптовая цена упаковки снеков (по 200 г), прибыль, налог на прибыль, издержки, срок окупаемости. Расчеты производились по методике ФГБОУ ВО «КГТУ» «Экономическое обоснование эффективности проектов в пищевой промышленности».

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Исследование эффективности извлечения белка и липидов из панцирного субстрата с использованием трипсина, химотрипсина и протосубтилина ГЗх

Сырьем для исследований выбраны ПСО вареной северной креветки. Дефростированная на воздухе варено-мороженая северная креветка подвергалась ручной разделке с посредством удаления панциря и головогруды. В состав ПСО входили панцирь головогруды и абдомена, а также остатки мышечной ткани креветки. Определен химический состав исследуемых ПСО (рисунок 3.1).

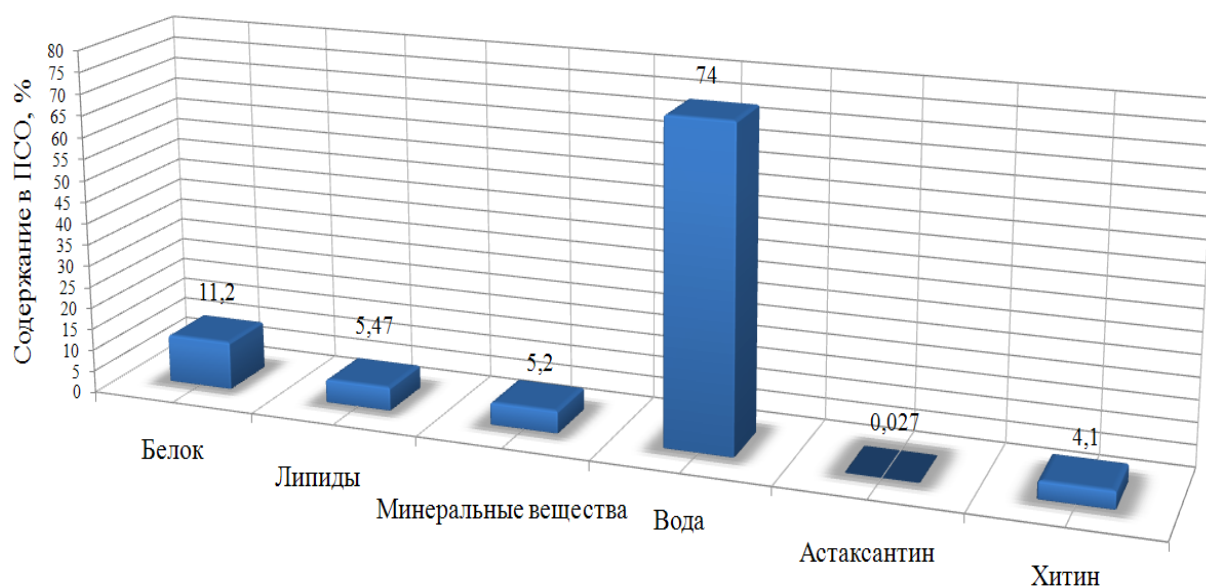


Рисунок 3.1 – Химический состав исследуемого ПСО

Определены микробиологические показатели сырья в соответствии с перечнем регламента таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Микробиологические показатели ПСО

Наименование показателя	Допустимый уровень (в соответствии с ТРЕАЭС 040/2016)	Значение показателя
Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), КОЕ/г (см ³), не более	2,0×10 ⁴	2,0×10 ³
Бактерии группы кишечных палочек (колиформы) (БГКП), не допускаются в массе продукции (г)	0,1	Не обнаружено
Сульфитредуцирующие клостридии, не допускаются в массе продукции (г)	1,0	Не обнаружено
Бактерии рода <i>Enterococcus</i> , КОЕ/г, не более	1.0×10 ³	1.0×10 ²
<i>S. aureus</i> , не допускаются в массе продукции (г)	1,0	Не обнаружено

Микробиологические показатели соответствуют установленным нормам, что позволяет использовать ПСО в качестве пищевого сырья (таблица 3.1).

Полученные ПСО измельчались на лабораторном волчковом устройстве ($D_{\text{ПСО}} = 2 - 5$ мм) и смешивались с водой. Температура полученной смеси составила 10 – 15 °С. Смесь была разделена на три равные части, к каждой был добавлен один из трех ферментов: ПГЗх, трипсин и химотрипсин. Гидролиз проводился при соотношении воды и ПСО – 4:1 (выбор значения гидромодуля основывался на анализе опубликованных исследований ученых М.М. Дяченко, А.Г. Артемова). Препараты трипсин и химотрипсин были взяты в дозировке 0,06 % от массы белка субстрата (исходя из рекомендаций Симпсона и Хаарда, предложенных в технологии получения каротинопротеинового комплекса, посредством гидролиза ПСО) [210]. ПГЗх был использован в количестве одинаковой активности по казеину с химотрипсином, то есть 0,5 % от массы белка ПСО. Гидролиз продолжался в течение 240 мин, при температуре 37 °С, в термостате при постоянном перемешивании.

Проведение гидролиза измельченных ПСО сопровождалось смещением значений pH гидролизата в щелочную сторону (рисунок 3.2).

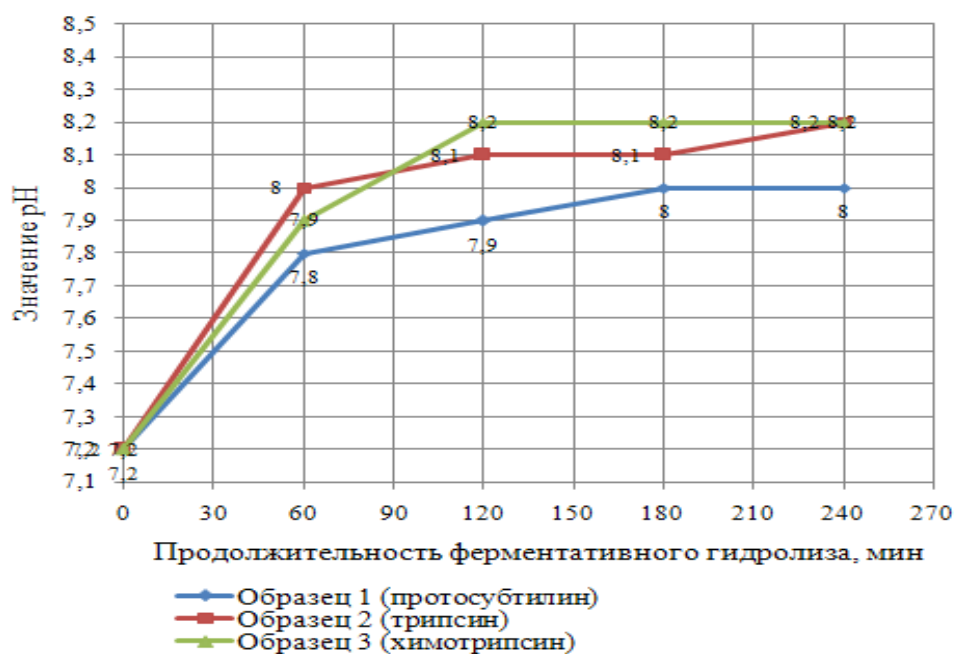


Рисунок 3.2 – Динамика изменения рН при гидролизе ПСО

Во всех исследуемых образцах наблюдалось смещение рН в щелочную среду, что обусловлено интенсивным накоплением в жидкой части гидролизата растворимых в воде продуктов гидролиза белка, влияющих на концентрацию ионов водорода (рисунок 3.2). У образцов 2 и 3 наблюдались более значительные сдвиги рН в щелочную сторону в сравнении с образцом 1, однако, несмотря на это, динамика рН для всех ферментов указывает на соответствие наиболее активной фазы гидролиза первым 120–180 минутам (120 мин для химотрипсина и трипсина, и 180 мин для ПГЗх).

В течение 240 мин гидролиза ПСО ферментом ПГЗх значение рН составляло не более 8,0 единиц. Известно, что оптимальную (для технологического использования) протеолитическую активность нейтральная протеиназа, содержащаяся в ПГЗх, проявляет при рН от 6,8 до 7,9, а щелочная протеиназа препарата проявляет максимальную активность только при значении рН в 9,0–10,0 единиц. Таким образом, в течение 240 мин наблюдаемая рН в большей степени способствует проявлению активности нейтральной протеиназы, характеризующейся более высокой эндопептидазной специфичностью. В период предположительно наиболее активного гидролиза рН не выходит за пределы оптимума, в связи, с чем дальнейшие исследования проводились без использования средства (вещества, проявляющие буфер) стабилизации рН.

По завершении 240 мин гидролиза ферментированные образцы были перенесены на фильтр с диаметром отверстий не более 1 мм для отделения крупной панцирной фракции, содержащей в основном хитин и минеральные вещества.

Фильтрованный гидролизат центрифугировался при скорости вращения ротора 4000 об/мин в течение 15 мин. По завершении центрифугирования гидролизата в емкостях образовались три фракции с видимой границей раздела фаз: жировая (оранжевая с красным оттенком); водная (мутная серовато-оранжевая жидкость); плотная (пастообразный белковый осадок).

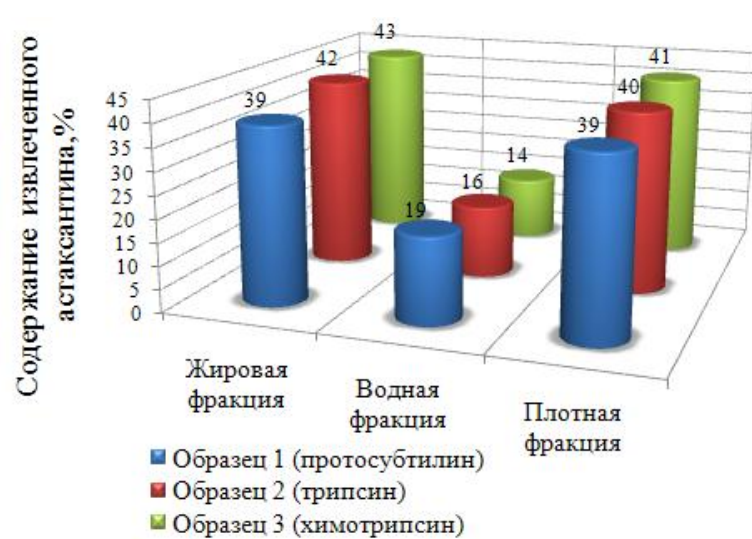
Жировые фракции не имеют ярко выраженных органолептических отличий между всеми исследуемыми образцами. Однако плотная фракция после обезвоживания в зависимости от типа протеазы имела ряд органолептических отличий (таблица 3.1.1). Для обезвоживания плотной фракции гидролизата применялась вакуумная сушка.

Таблица 3.1.1 – Органолептические характеристики обезвоженных плотных фракций

Органолептические показатели	Образец 1 (полученный при гидролизе ПСО ПГ3х)	Образец 2 (полученный при гидролизе ПСО трипсином)	Образец 3 (полученный при гидролизе ПСО химотрипсином)
Внешний вид	Порошок серо-желтоватого цвета, без посторонних оттенков	Порошок серо-оранжевого цвета, без посторонних оттенков	Порошок серо-оранжевого цвета, без посторонних оттенков
Запах	Выраженный запах сушеной креветки, без посторонних запахов	Ярко выраженный запах сушеной креветки, без посторонних запахов	Ярко выраженный запах сушеной креветки, без посторонних запахов
Вкус	Концентрированный вкус креветки, без посторонних привкусов	Концентрированный вкус креветки, без посторонних привкусов	Концентрированный вкус креветки, без посторонних привкусов
Цвет	Серо-желтый	Серо-оранжевый	Серо-оранжевый
Консистенция	Сухая, рассыпчатая, однородная	Сухая, рассыпчатая, однородная	Сухая, рассыпчатая, однородная

Образец, выработанный с использованием ПГ3х, имеет менее выраженные цвет и запах в сравнении с двумя другими образцами, что может быть связано с различным содержанием липидов и каротиноидов, в том числе различных форм последних (свободные или связанные с белком). Образцы 2 и 3 получили равнозначную органолептическую характеристику по всем критериям оценки (таблица 3.1.1).

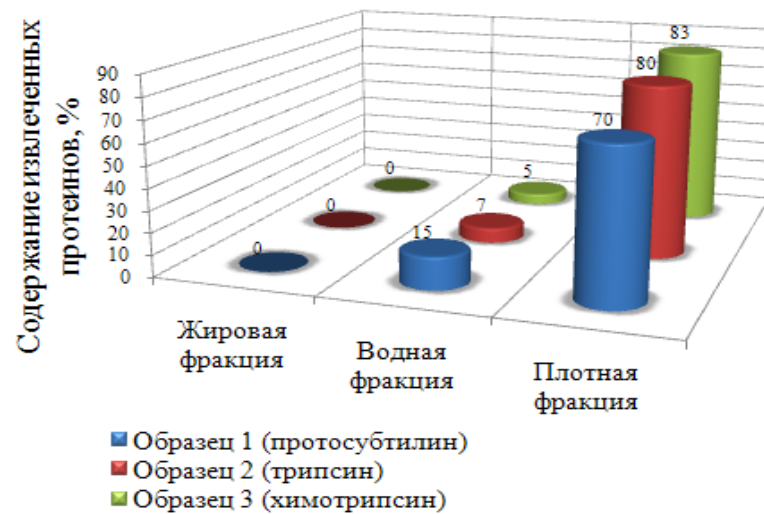
Проведены химические исследования образовавшихся после центрифугирования фракций. С учетом химического состава жировой, водной и белковой фракций и их массовых соотношений построены диаграммы распределения протеина, липидов и астаксантина (рисунок 3.3 и таблица 3.1.2). Расчеты производились на сухом веществе от общего количества каждого из вышеперечисленных компонентов в ПСО.



(A)



(B)



(B)

Рисунок 3.3 – Распределение астаксантина (А), липидов (Б) и протеина (В) по фракциям после центрифугирования фильтрованного гидролизата

Таблица 3.1.2 – Степень извлечения основных компонентов из ПСО

Используемые в гидролизатах ферменты	Цена фермента за 1 грамм, руб.	Массовая доля извлекаемых компонентов от общего содержания в ПСО, %		
		Протеин	Астаксантин	Липиды
Протосубтилиин ГЗх	0,4	85,6 ± 0,2	97,1 ± 0,2	94,5 ± 0,2
Трипсин	5,5	87,1 ± 0,3	98,1 ± 0,1	95,4 ± 0,1
Химотрипсин	5,9	88,2 ± 0,3	98,2 ± 0,3	95,6 ± 0,2

Выход сухих веществ в составе плотной фракции в образце 1 (ПГЗх) на 10–12 % ниже по сравнению с образцами 2 и 3. При использовании ПГЗх (образец 1) наблюдаются большие потери астаксантина и белка в водной фракции по отношению к плотной фракции, в сравнении с аналогичными показателями в образцах 2 и 3, однако разница была не столь существенна (рисунок 3.3 и таблица 3.1.2), как при сравнении этих же эндопептидаз животного происхождения с другими микробными ферментами [210]. В работах Б.К. Симпсона отмечается, что при использовании ферментного препарата микробного происхождения по сравнению с животными протеазами при одинаковой степени депротенизации ПСО наблюдается меньший выход белков и каротиноидов в составе плотной фракции. Данное явление связывалось с более низкой специфичностью данных ферментов. Однако в рассматриваемом случае при использовании микробной протеиназы (ПГЗх) в количественном эквиваленте активности по казеину к трипсину удалось выделить целевую безхитиновую ферментализованную массу, приближенную по содержанию протеина, липидов и астаксантина к массам, полученным при использовании сериновых протеиназ животного происхождения (таблица 3.1.2). Следовательно, применение протосубтилина ГЗх в технологии выделения белкового гидролизата из ПСО позволит снизить себестоимость конечного продукта

Дальнейшие исследования направлены на поиск технологических решений и условий обеспечения максимального выхода целевых компонентов из ПСО с использованием ПГЗх.

3.2 Исследование влияния процессов предварительной обработки на гидролиз панцирного субстрата протосубтилином ГЗх

Изучение влияния процессов предварительной механической обработки ПСО на интенсивность накопления сухих веществ в отфильтрованной от хитина ферментализованной массе может способствовать решению задачи по увеличению концентрации каротиноидов (в частности, астаксантина) в целевом продукте (обезвоженном гидролизате), а также достижению его наибольшего выхода.

3.2.1 Влияние предварительного гидромеханического удаления части мягкого эпителия на интенсивность депротеинизации панцирного субстрата и степень гидролиза белка

Степень гидролиза белка может напрямую влиять на разделение липидов и белков по фракциям (жировую, водную или плотную). Известно, что в зависимости от молекулярной массы образующихся продуктов гидролиза их эмульсионные свойства могут как уменьшаться, так и увеличиваться по сравнению с исходными протеинами. Также эмульгирующие свойства могут зависеть и от положения в полипептидной цепи связей, по которым преимущественно происходит гидролиз [29, 59, 66, 75, 97, 100]. Таким образом, количество высвобождаемой из гидролизатов жировой фракции может зависеть от степени гидролиза и специфичности действия ферментов. Также необходимо учитывать, что с увеличением глубины гидролиза увеличиваются потери АСВ (адсорбирующихся на поверхности дисперсных образований или в растворенном виде) и жира (в том числе и связанного с каротиноидами), переходящих в состав дисперсных образований.

Можно предположить, что у ПСО с частично удаленным гидромеханическим способом мягким эпителием гидролиз оставшегося белка будет происходить более равномерно (что может способствовать получению белка с необходимой степенью гидролиза), без отставания по фазе от более легкодоступного для ферментативной атаки субстрата, т.е. белка, удаляемого в рассматриваемом случае вместе с мягкими тканями.

Для подтверждения выдвинутых предположений о возможном влиянии предварительного удаления мягких тканей из ПСО на динамику накопления АСВ (ОА, НБА) при гидролизе проведены сравнительные сопоставления динамики выше перечисленных показателей для случая использования данной операции и без ее применения (рисунок 3.4).

Продолжительность проводимого процесса гидромеханической обработки ПСО составляла 5 мин при температуре воды 10 °С и соотношении ПСО и воды 1/4. Для всех исследуемых образцов использовались равнозначные значения – дозировка фермента (0,5 % от массы белка ПСО) и гидромодуль (4:1).

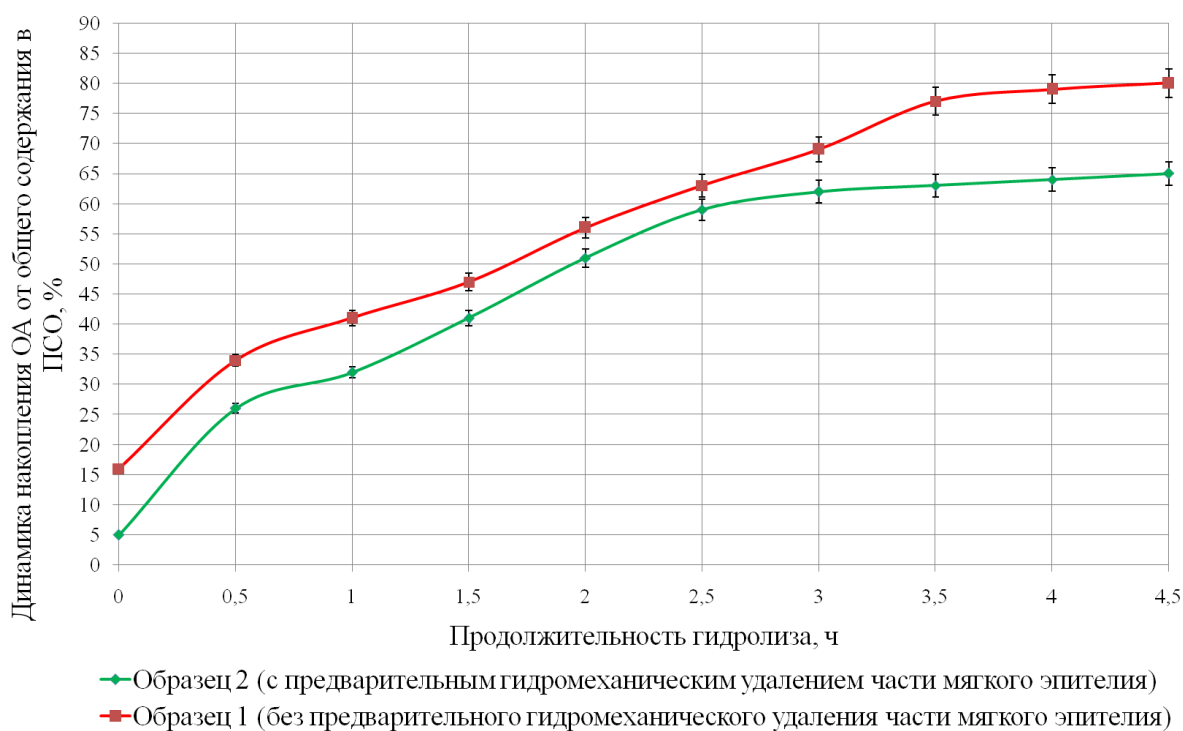


Рисунок 3.4 – Динамика накопления ОА в отфильтрованном от панциря гидролизате

Динамика накопления ОА в гидролизате (гидролизуемой массе) схожа в течение первых 2,5 ч во всех исследуемых образцах (рисунок 3.4), вне зависимости от наличия предварительного гидромеханического удаления мягкого эпителия (образец 2). Для каждого из рассматриваемых случаев следует отметить наличие перехода в гидролизат в начальный момент времени (от 0,0 до 0,5 ч) некоторого количества протеина. Часть белка (до 25%), входящего в состав мягкого эпителия, удаляется гидромеханическим способом перед началом ФГ. Гидромеханические силы, возникающие при контакте измельчающего органа с сырьем (ПСО) и водой, в большей степени способствуют высвобождению белковых веществ (в том числе в виде взвесей) на начальном этапе (до 2,5 ч), что оказывает влияние на общий выход ОА.

Активная фаза перехода ОА в гидролизат для ПСО, не подвергнутых гидромеханической обработке, значительно превышает таковую в случае частичного удаления мягких тканей.

Таким образом, применение предварительной гидромеханической депротеинизации позволяет сократить продолжительность последующей ферментативной обработки с точки зрения обеспечения необходимого выхода протеина.

Проведены исследования по влиянию предварительной гидромеханической депротеинизации на динамику изменения степени гидролиза (рисунок 3.4.1).

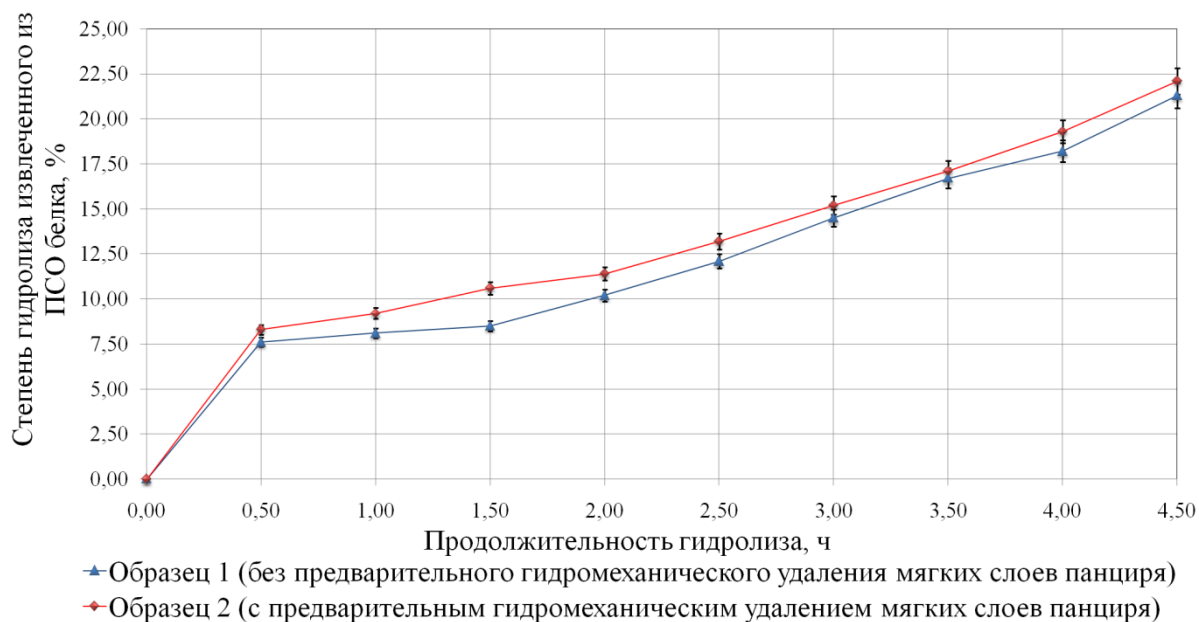


Рисунок 3.4.1 – Динамика степени гидролиза белка, перешедшего в отфильтрованный от панцирей гидролизат

Применение предварительной гидромеханической депротеинизации оказывает влияние на динамику гидролиза, что заметно на интервале от 0,5 до 2,0 часов (рисунок 3.4.1). С другой стороны, необходимо учитывать, что с увеличением продолжительности гидролиза снижается доля протеина, который может быть осажден центрифугированием или с применением осаждающего агента. Доля возможных потерь белка оценивали по показателю НБА (рисунок 3.4.2).

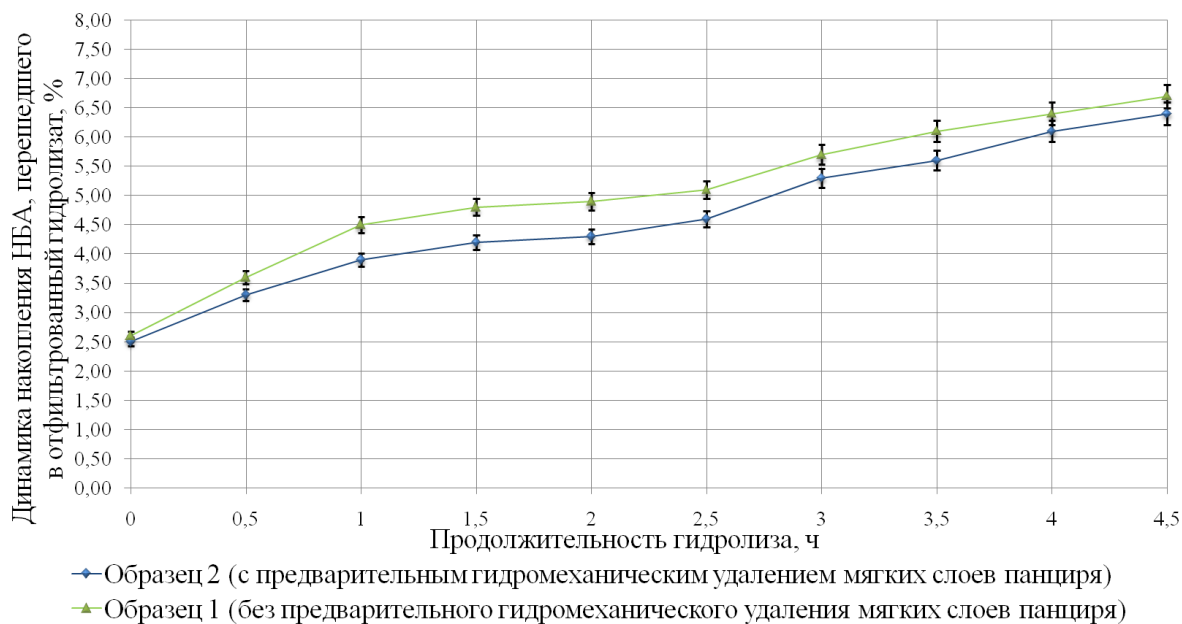


Рисунок 3.4.2 – Динамика накопления НБА в отфильтрованном от панцирей гидролизате

Динамику накопления НБА в обоих образцах можно разделить на три этапа (рисунок 3.4.2). Первый этап (от 0,0 до 1,0 ч), в течение которого наблюдалось интенсивное накопление НБА (1,4% в час для Образца 2 и 1,9 % в час для Образца 1). Второй этап (от 1,0 до 2,0 ч), в течение которого наблюдалось снижение средней скорости (до 0,4% в час), возможно также вследствие снижения средней скорости накопления аминного азота в целом. Третий этап (от 2,0 до 4,5 ч) характеризовался увеличением средней скорости накопления НБА для всех образцов (1,05% в час для Образца 2 и 0,9 % в час для Образца 1), что, возможно, связано с превалированием реакций распада более низкомолекулярных протеинов. В образце 2 наблюдаются меньшие потери белка в виде НБА для промежутка от 1,0 до 4,0 ч по сравнению с аналогичным показателем Образца 1.

Таким образом, ферментирование ПСО с частично удаленным мягким эпителием позволяет достичь больших значений степени гидролиза при меньшей доли потерь протеина, чем без использования указываемой операции.

3.2.2 Влияние механической обработки панцирного субстрата на интенсивность ферментативного гидролиза

В ходе эксперимента было исследовано четыре образца: с приближенно–полным механическим удалением белкового (клеточного) слоя и без него – ПСО неизмельченные с клеточным слоем (ПСО_{ни}), ПСО неизмельченные без клеточного слоя (ПСО_{бксни}), ПСО измельченные ($D_{\text{ПСО}} = 2-5$ мм) с клеточным слоем (ПСО_и), ПСО измельченные ($D_{\text{ПСО}} = 2-5$ мм) без клеточного слоя (ПСО_{бкси}).

Гидролиз продолжался 240 мин при 37 °С, гидромодуле (соотношение воды и ПСО) 4 : 1 и дозировки ПГЗх в 0,5% от массы белка гидролизуемого субстрата. Результаты эксперимента представлены в форме описания внешнего вида отфильтрованного от крупного панциря гидролизата (таблица 3.2) и количественной оценки содержания ОА в отфильтрованном от крупного панциря гидролизате (таблица 3.2.1).

Таблица 3.2 – Визуальная характеристика отфильтрованных гидролизатов в зависимости от степени механической обработки при ферментативном гидролизе ПСО [79]

Наименование образцов	Продолжительность процесса гидролиза			
	60 мин (1,0 ч)	120 мин (2,0 ч)	180 мин (3,0 ч)	240 мин (4,0 ч)
ПСО _{ни}	Появление мутности жидкости, появление отдельных взвесей	Преобладание желтого оттенка, увеличение концентрации взвесей, увеличение количества взвесей	Сильная мутность жидкости, появление слабо оранжевого оттенка, взвеси наблюдаются в меньшей степени	Жидкость стала желто-оранжевого цвета. Взвеси не наблюдаются
ПСО _{бксни}	Появление опалесцирующей мутности жидкости	Появление слабой мутности жидкости. Взвеси не наблюдаются	Увеличение мутности жидкости. Взвеси не наблюдаются	Появление желтого оттенка. Взвеси не наблюдаются
ПСО _и	Сильное помутнение жидкости с желтым оттенком, появление взвесей	Сильная мутность жидкости желто-оранжевого цвета, увеличение концентрации взвесей	Сильная мутность жидкости, преобладание оранжевого оттенка, взвеси практически не наблюдаются	Полное изменение окраса жидкости в оранжевый цвет
ПСО _{бкси}	Появление слабо опалесцирующей мутности жидкости. Взвеси не наблюдаются	Появление слабой мутности жидкости слабо желтого цвета. Взвеси не наблюдаются	Желтый цвет жидкости стал насыщенным. Взвеси не наблюдаются	Изменений не наблюдается. Цвет жидкости желтый насыщенный. Взвеси не наблюдаются

Визуальная оценка образцов с различным характером механической обработки позволила косвенно зафиксировать поэтапный переход продуктов гидролиза ПСО (липидов, каротиноидов, протеина) в отфильтрованный от крупных панцирей гидролизат (таблица 3.2).

При продолжительности гидролиза в 60 – 120 мин в образцах с ПСО_и и ПСО_{ни} наблюдалось изменение прозрачности – помутнение отфильтрованного гидролизата и появление взвесей, что может быть обусловлено отщеплением от клеточного слоя ПСО протеина. Между 120-ой и 240-ой минутами гидролиза наблюдалось появление слабого желтого цвета в гидролизате из ПСО_и и желтого оттенка в гидролизате из ПСО_{ни}, что

объясняется переходом каротиноидов и липидов в отфильтрованный от панциря гидролизат.

В образцах ПСО_{БКСИ} и ПСО_{БКНИ} (от 60 до 120 мин) наблюдалось помутнение гидролизата без образования взвесей, что объясняется возможным извлечением протеина из бесклеточной основы хитино-минерального субстрата. Образование желтого оттенка (цвета) в гидролизате (после 180 мин) характеризуется возможной экстракцией каротиноидов, липидокаротиноидов и каротинопротеинов из пигментного слоя кутикулы ПСО.

Для подтверждения вышеизложенного предположения изучена динамика накопления ОА в гидролизатах (таблица 3.2.1).

Таблица 3.2.1 – Динамика накопления ОА в отфильтрованном от твердой (хитино-минеральной) части гидролизате

Продолжительность гидролиза, ч	Динамика накопления ОА в гидролизате, от начального содержания в ПСО, %			
	Образец с ПС _{НИ}	Образец с ПСО _И	Образец с ПСО _{БКНИ}	Образец с ПСО _{БКСИ}
0,0	2,3 ± 0,1	6,5 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,1
0,5	11,3 ± 0,2	19,1 ± 0,1	0,5 ± 0,4	1,8 ± 0,4
1,0	20,4 ± 0,2	24,3 ± 0,4	1,9 ± 0,3	2,9 ± 0,4
1,5	25,1 ± 0,1	30,1 ± 0,5	3,1 ± 0,5	5,1 ± 0,1
2,0	33,2 ± 0,5	40,3 ± 0,2	5,2 ± 0,1	7,2 ± 0,4
2,5	42,3 ± 0,4	49,2 ± 0,4	6,1 ± 0,2	8,2 ± 0,5
3,0	52,1 ± 0,2	68,9 ± 0,3	6,9 ± 0,4	8,9 ± 0,2
3,5	66,4 ± 0,3	79,9 ± 0,4	7,9 ± 0,5	10,9 ± 0,2
4,0	72,9 ± 0,4	82,5 ± 0,6	11,3 ± 0,1	14,4 ± 0,3
4,5	77,3 ± 0,2	83,3 ± 0,4	12,1 ± 0,2	15,2 ± 0,2

Динамика накопления ОА при продолжительности гидролиза от 0,0 до 3,0 ч для образцов ПСО_И и ПСО_{НИ} характеризуется интенсивной ферментативной экстракцией протеина (таблица 3.2.1).

Причиной, по которой наблюдается более значительный переход в гидролизат белковых веществ у ПСО_И (по сравнению с ПСО_{НИ}), является увеличение площади контакта белкового субстрата с протеазой [79]. Гидролиз на интервале от 3,0 до 4,5 ч для образца ПСО_И характеризовался снижением скорости перехода ОА в отфильтрованный от панциря гидролизат, что объясняется значительным уменьшением количества легкодоступных белков клеточного эпителия. Для ПСО_{НИ} на интервале 3,0 – 4,5 ч не наблюдалось значительного снижения интенсивности перехода белковых веществ в отфильтрованный от панцирей гидролизат.

Полученные результаты по динамике накопления ОА согласуются с данными по визуальной оценке (таблица 3.2).

В образцах ПСО_{БКСИ} и ПСО_{БКСНИ} при продолжительности гидролиза до 3,5 ч наблюдалась одинаковая интенсивность накопления ОА в отфильтрованном от панциря гидролизате (таблица 3.2.1). Дальнейшая продолжительность гидролиза образцов ПСО_{БКСИ} и ПСО_{БКСНИ} (длительностью от 3,5 до 4,0 ч) характеризуется небольшим ускорением процесса накопления ОА, что может быть связано с постепенным проникновением ПГЗх по поровым каналам к пигментному слою панциря, содержащему достаточное количество белка, и способного более легко гидролизироваться в сравнении с белком кутикулярных фибрилл (подраздел 1.1).

Для того чтобы показать влияние механической обработки на степень извлечения протеина, липидов и каротиноидов (астаксантина) из бесклеточного остатка панциря (внешних и внутренних кутикулярных слоев) определялось остаточное содержание вышеперечисленных компонентов после 4,0 ч гидролиза (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Химический состав частично гидролизованных ПСО

Образцы ПСО после гидролиза	Количество протеина в % от начального содержания в панцире	Количество липидов в % от начального содержания в панцире	Количество астаксантина в % от начального содержания в панцире
ПСО _{НИ}	20,3 ± 2,4	17,1 ± 1,2	2,70 ± 0,06
ПСО _{БКСНИ}	16,4 ± 1,9	10,2 ± 1,1	0,11 ± 0,05
ПСО _И	13,1 ± 1,8	6,5 ± 1,4	1,70 ± 0,10
ПСО _{БКСИ}	10,2 ± 2,2	4,2 ± 0,9	0,06 ± 0,03

Механическое воздействие на панцирный субстрат позволяет повысить степень извлечения протеина, липидов и астаксантина из ПСО. В измельченном ПСО (ПСО_И) на 7,2 %, липидов на 10,6 % и астаксантина на 1 %, в сравнении с аналогичными показателями в неизмельченных ПСО (ПСО_{НИ}). В измельченных ПСО без клеточного слоя (ПСО_{БКСИ}) протеина меньше на 6,2%, липидов на 6 % и астаксантина на 0,06 % по сравнению с ПСО (ПСО_{БКСНИ}), не подвергшимся измельчению (таблица 3.3).

Сопоставление образцов ПСО_И и ПСО_{НИ} показало, что при одинаковой динамике накопления ОА (таблица 3.2.1) при гидролизе в течение 4,0 часов общий уровень выхода протеина, астаксантина и липидов для измельченных образцов выше (таблица 3.3). Аналогичное заключение делается в отношении образцов ПСО_{БКСИ} и ПСО_{БКСНИ}.

Однако следует отметить, что в отличии от ПСО_И и ПСО_{НИ} после 3,0 ч (таблица 3.2.1) у образцов с удаленным клеточным слоем наблюдается ускорение (по сравнению с

продолжительностью от 0,0 до 3,0 ч) извлечения ОА. Можно предположить, что наблюдаемое явление может быть связано с резким изменением степени влияния диффузионных факторов (некоторым ослаблением) на гидролиз панциря в определенный момент времени, при этом удаление клеточного слоя способствует сокращению продолжительности гидролиза, необходимой для его наступления.

Характер гидролиза образцов ПСО_{БКСИ} и ПСО_{БКСИ} определялся с учетом значения кинетического параметра (n) (таблица 3.4) и коэффициента конверсии ($\ln F$) на интервалах 60–180 мин (рисунки 3.5) и 190–270 мин (рисунки 3.6). Полученные данные о зависимости коэффициента конверсии ($\ln F$) от продолжительности ($\ln t$) были представлены в виде графиков.

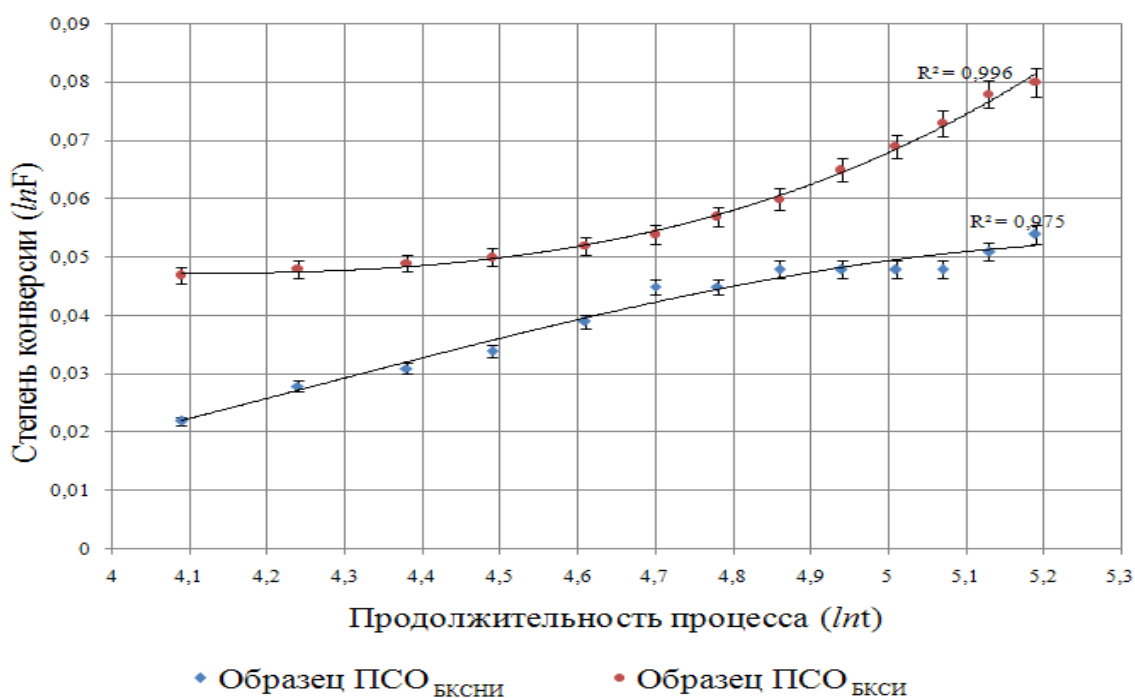
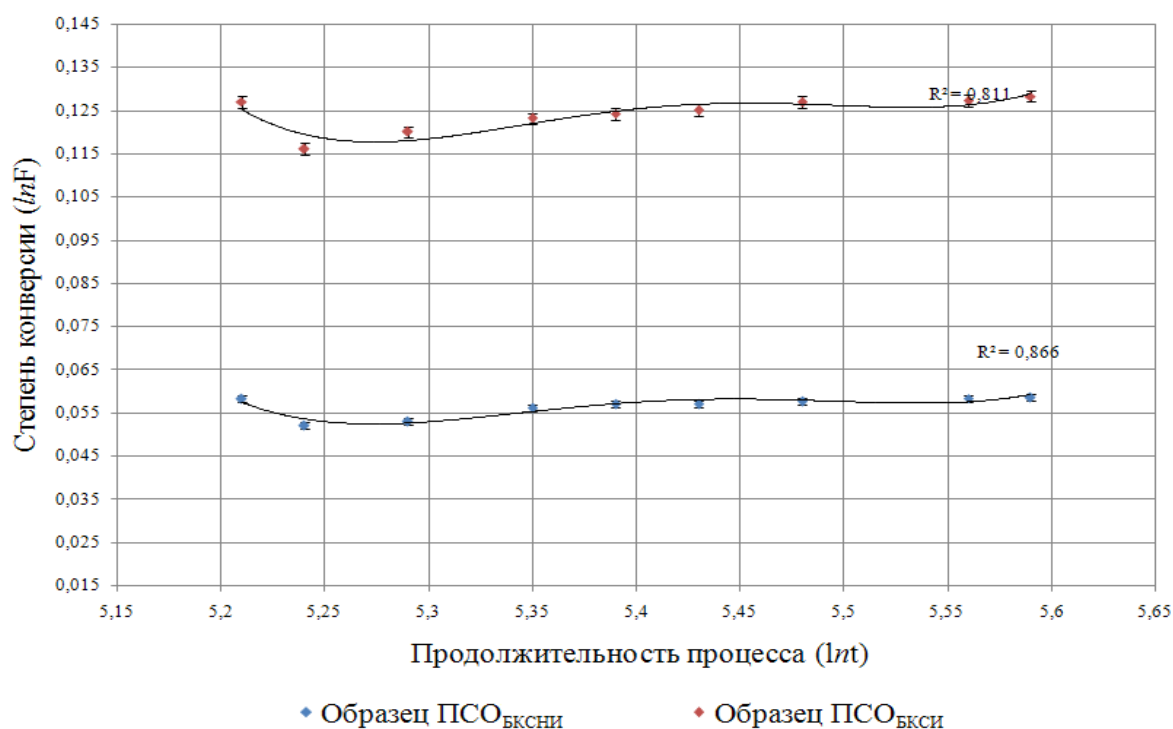


Рисунок 3.5 – Зависимость степени конверсии для образцов ПСО_{БКСИ} и ПСО_{БКСИ} на интервале от 60 до 180 мин



(Б)

Рисунок 3.6 – Зависимость степени конверсии для образцов ПСО_{БКСИ} и ПСО_{БКСНИ} на интервале от 190 до 270 мин

Для каждого из рассматриваемых случаев были получены приемлемые коэффициенты корреляции и установлены кинетические параметры (n), характеризующие процессы гидролиза, в аспекте преобладания диффузионного или кинетического характера ферментативного гидролиза (таблица 3.4). При значении $n \approx 0,5$ гидролиз приобретает диффузионный характер. При значении $0,5 < n < 1$ возрастает влияние кинетических процессов до равнозначного значения: с увеличением параметра « n » возрастает вклад кинетических факторов в характер гидролиза ПСО (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Зависимость кинетического параметра от продолжительности гидролиза

Наименование образцов	Параметры, характеризующие механизмы процесса гидролиза (n)	Преобладающий характер ферментативного гидролиза ($0,5 < n < 1,0$)	Коэффициент корреляции (зависимость $\ln F$ от $\ln t$)
Продолжительность от 60 до 180 мин			
ПСО _{БКСИ}	$0,76 \pm 0,03$	Кинетический (неявно)	0,996
ПСО _{БКСНИ}	$0,62 \pm 0,01$	Диффузионный	0,975
Продолжительность от 190 до 270 мин			
ПСО _{БКСНИ}	$0,72 \pm 0,02$	Диффузионный (неявно)	0,866
ПСО _{БКСИ}	$0,85 \pm 0,01$	Кинетический	0,811

Продолжительность процесса гидролиза от 60 до 180 мин характеризуется преобладанием влияния диффузионных факторов для ПСО_{БСКНИ} и в меньшей степени для ПСО_{БСКИ} (таблица 3.4). К концу процесса депротеинизации (190–270 мин) наблюдается усиление влияния кинетических факторов как в ПСО_{БСКНИ}, так и в ПСО_{БСКИ}. Полученные данные таблицы 3.4 косвенно подтверждают предположение о том, что гидролиз бесклеточной основы панциря может происходить с преобладанием как диффузионных, так и кинетических факторов в зависимости от продолжительности процесса. Таким образом, влияние диффузионных факторов на степень депротеинизации ПСО будет учтено при выборе рациональной продолжительности и кратности ферментативной обработки. Предполагается, что для более полного извлечения протеина и астаксантина необходимо проводить ферментативную обработку ПСО в две ступени, где первая ступень предварительно гидромеханически депротеинированных ПСО обеспечивает полное удаление с поверхности ПСО эпителиально-клеточного слоя, а вторая ступень будет характеризоваться гидролизом протеинов бесклеточной кутикулы.

3.3 Обоснование технологии белковых гидролизатов для создания комбинированных снеков

Необходимость ферментативного гидролиза ПСО, в том числе с использованием недорогой протеиназы (ПГЗх), объясняется возможностью выделения биологически ценных компонентов (протеина, астаксантина, липидов, каротинопротеинов, липидокаротиноидов и т.д.) в необходимых соотношениях и формах (в том числе и обезвоженной). Наибольший интерес представляет использование обезвоженных белковых гидролизатов (в том числе включающих в себя астаксантин) в качестве основной составляющей рецептуры комбинированных снеков, так как это может повысить биологическую ценность конечного продукта.

3.3.1 Обоснование параметров гидролиза с учетом накопления аминокрупп и липидов в жидкой декантированной фракции гидролизата

По сравнению с ферментными препаратами более высокой степени очистки (ПГ10х, ПГ20х, ПГ25х) ПГЗх характеризуется большим (140 % массового содержания щелочной протеиназы) соотношением нейтральной протеиназы к щелочной. Известно, что нейтральные протеазы ПГЗх представлены преимущественно эндопептидазами, отщепляющими от белкового субстрата длинноцепочечные пептиды [40,61,205].

Щелочная протеаза ПГЗх характеризуется массовым преобладанием экзопротеазы, которая отщепляет от белкового субстрата пептиды с поверхностно-активными свойствами. С учетом этого при гидролизе ПСО в области предлагаемых значений pH ПГЗх в большей степени склонен к образованию пептидов, не обладающих выраженными поверхностно-активными свойствами (пункты 1.3.6 – 1.3.8 и подраздел 1.5).

Использованы следующие дозировки фермента – 0,3 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,7 % и 0,8 % – к общей массе белка ПСО. Дозировка фермента, равная 0,5 % от массы белка ПСО, соответствует равнозначной рекомендованной дозировке трипсина на 100 г белкового субстрата (по казеину) [210]. Процесс гидролиза продолжался 270 мин при температуре 37 °С. Гидромодуль составил 4:1, скорость вращения ротора центрифуги – 4000 об/мин в течение 15 мин. Предварительная гидромеханическая депротеинизация не проводилась. Образовавшиеся фракции (жировые, водные и плотные) высушивались в вакуумной установке, после чего в каждой определялось содержание липидов.

Таблица 3.5 – Динамика накопления липидов в водной фракции

Продолжительность гидролиза, мин	Количество липидов водной фракции от общего количества извлеченного из ПСО жира, % / дозировка ПГЗх, % к массе белка					
	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
0	2,61±0,04	2,41±0,04	2,31±0,02	2,31±0,06	2,42±0,04	2,51±0,05
30	2,92±0,03	2,84±0,02	2,71±0,01	2,85±0,04	2,91±0,01	3,21±0,03
60	3,52±0,01	3,42±0,04	3,22±0,03	3,19±0,03	3,22±0,05	3,33±0,04
90	3,94±0,05	3,82±0,03	3,71±0,01	3,61±0,03	3,53±0,01	3,61±0,02
120	4,32±0,03	4,25±0,04	4,10±0,02	3,95±0,04	3,85±0,02	3,99±0,05
150	4,71±0,04	4,68±0,07	4,62±0,04	4,52±0,08	4,45±0,01	4,65±0,01
180	5,11±0,05	4,87±0,04	4,81±0,04	4,79±0,05	4,75±0,02	4,91±0,03
210	5,15±0,04	5,09±0,04	4,92±0,03	4,91±0,05	4,86±0,03	5,12±0,05
240	5,18±0,01	5,14±0,01	4,99±0,02	4,98±0,08	4,96±0,04	5,22±0,07
270	5,22±0,04	5,15±0,05	5,11±0,02	5,09±0,04	5,05±0,05	5,25±0,04

Наиболее интенсивное накопление липидов в водной фракции для всех образцов наблюдается в течение первых 150 мин гидролиза, что объясняется как доступностью для эмульгирования жира, высвобожденного в результате гидролиза ПСО, так и образованием пептидов, обладающих поверхностно-активными свойствами. Дальнейшая (от 150 до 270 мин) динамика характеризовалась снижением активности накопления липидов в водной фракции, что, возможно, связано со снижением пептидов с выраженными поверхностно-активными свойствами в совокупности с параллельными реакциями протеолитического распада пептидов в составе мембран эмульсии (таблица 3.5).

Однако при дозировке ПГЗх в 0,7 % после 90-й минуты наблюдается минимальная концентрация липидов в водной фракции по сравнению с другими образцами. При

дальнейшем гидролизе (после 120 мин) наблюдается сопоставимая с другими образцами динамика накопления липидов в водной фракции.

Известно, что эмульгирующие свойства гидролизатов зависят от концентрации поверхностно активных пептидов, которая зависит от общей степени гидролиза белка [35, 58, 62, 100, 106]. Следовательно, для косвенной оценки динамики накопления пептидов водной фракции, обладающих, в том числе, способностью стабилизировать липиды, исследовалась динамика накопления ФТА в водной фракции (таблица 3.5.1).

Таблица 3.5.1 – Динамика изменения ФТА водной фракции

Продолжительность гидролиза, мин	Динамика накопления ФТА, мг/100 г / дозировка ПГЗх, % к массе белка					
	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
0	5,62±0,04	5,71±0,04	5,77±0,04	5,89±0,02	6,24±0,04	6,14±0,03
30	7,05±0,07	7,08±0,05	7,15±0,03	7,02±0,01	3,91±0,05	7,12±0,04
60	7,76±0,05	7,89±0,01	7,87±0,04	7,72±0,03	7,62±0,02	7,93±0,01
90	8,12±0,03	8,15±0,03	8,24±0,07	8,12±0,04	7,94±0,01	8,21±0,07
120	8,63±0,01	8,63±0,04	8,65±0,03	8,49±0,05	8,19±0,02	8,56±0,04
150	9,14±0,04	9,21±0,02	9,34±0,02	9,39±0,01	9,52±0,02	9,62±0,06
180	9,61±0,05	9,87±0,01	10,14±0,04	10,05±0,03	9,95±0,03	10,12±0,04
210	10,15±0,03	10,15±0,02	10,36±0,04	10,35±0,01	10,42±0,01	10,63±0,03
240	10,62±0,04	10,91±0,06	11,12±0,05	11,05±0,04	10,94±0,07	11,24±0,01
270	11,64±0,02	11,72±0,04	11,51±0,04	11,78±0,04	11,84±0,05	11,91±0,04

Динамика накопления ФТА (таблица 3.5.1) для всех исследуемых образцов была схожей. Однако в промежутке от 60 до 120 мин при дозировке ПГЗх в 0,7 % наблюдается снижение интенсивности роста ФТА. После 120 мин гидролиза фиксируется ускорение динамики накопления ФТА во всех исследуемых образцах, что может объясняться некоторым увеличением активности щелочной протеазы ПГЗх (подраздел 3.1).

Был определен параметр гидролиза (К), отражающий соотношение между степенью гидролиза и интенсивностью депротенизации ПСО (формула 3.1, таблица 3.5.2).

$$K = \frac{\frac{\text{ФТА}_2 - \text{ФТА}_1}{\text{ОА}_{\text{сусп}} - \text{ФТА}_1}}{\frac{\text{ОА}_{\text{сусп}}}{\text{ОА}_{\text{ПСО}}^{\text{const}}}} = \frac{\text{ФТА}_2 - \text{ФТА}_1 \times \text{ОА}_{\text{ПСО}}^{\text{const}}}{\text{ОА}_{\text{сусп}} - \text{ФТА}_1 \times \text{ОА}_{\text{сусп}}} = \frac{\text{ФТА}_2 - \text{ФТА}_1}{\text{ОА}_{\text{сусп}} - \text{ФТА}_1 \times \text{ОА}_{\text{сусп}}} = \frac{\text{ФТА}}{\text{ОА}_{\text{сусп}}^2} = \frac{\text{ФТА}}{\text{ОА}^2} \times 100 \%, \quad (3.1).$$

Таблица 3.5.2 – Динамика накопления ФТА водной фракции к ОА², перешедшего в фильтрованный гидролизат

Продолжительность гидролиза, мин	Отношение ФТА водной фракции к ОА ² гидролизата, % / дозировка ПГЗх, % к массе белка ПСО					
	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
0	–	–	–	–	–	–
30	11,9±0,2	11,9±0,2	12,1±0,2	12,1±0,2	12,1±0,3	12,2±0,2
60	12,3±0,1	12,4±0,3	12,6±0,3	12,6±0,3	12,5±0,2	12,6±0,3
90	12,9±0,2	13,0±0,1	13,2±0,2	12,9±0,1	12,8±0,1	13,1±0,1
120	13,4±0,3	13,4±0,2	13,4±0,1	13,4±0,4	13,1±0,1	13,5±0,1
150	14,1±0,1	14,1±0,3	13,9±0,2	14,0±0,3	14,1±0,2	14,2±0,3
180	14,6±0,2	14,5±0,2	14,4±0,3	14,4±0,2	14,3±0,1	14,5±0,2
210	14,9±0,1	14,8±0,3	14,6±0,1	16,6±0,3	14,7±0,2	14,8±0,1
240	15,1±0,3	14,9±0,1	14,8±0,3	14,9±0,1	14,9±0,3	15,1±0,3
270	15,2±0,2	15,1±0,1	15,1±0,1	15,0±0,2	15,1±0,1	15,2±0,2

Рост указываемого соотношения наблюдался во всех образцах в течение 270 мин (таблица 3.5.2). Резкое увеличение данного показателя после 120 мин гидролиза, что связано с замедлением депротеинизации ПСО и одновременным увеличением роста ФТА (таблица 3.5.1). После 120 мин количество липидов и ФТА водной фракции резко начинают расти, в тоже время интенсивность депротеинизации резко падает. Увеличивается интенсивность накопления ФТА после 120 мин, по всей видимости, это связано с образованием пептидов, обладающих поверхностно-активными свойствами, что в свою очередь влияет на количество липидов, остающихся в водной фракции в эмульгированном виде.

Динамику ФТА / ОА² при дозировке ПГЗх в 0,5 %, 0,6 % и 0,7 % можно разделить на две стадии (от 0 до 120 мин и от 120 до 270 мин), при этом наименьшее соотношение ФТА / ОА² на первой стадии наблюдается при дозировке ПГЗх в 0,7%. Динамика гидролиза ПСО при дозировке ПГЗх в 0,3 % и 0,8 % также характеризуется двумя стадиями, однако увеличение ФТА / ОА² в водной фракции наблюдается после 90 мин.

Применение ПГЗх в дозировке 0,3 % и 0,4 % недостаточно для одновременного гидролиза, отщепленного от ПСО белка и депротеинизации панцирного субстрата, вследствие чего основная часть фермента тратится на гидролиз отщепленных от ПСО белковых образований. При максимальной дозировке фермента в 0,8% обеспечивается большая интенсивность депротеинизации ПСО, однако не задействованная в данном процессе часть фермента интенсивно гидролизует белок, отщепленный от панциря, с образованием большого количества пептидов с выраженными поверхностно-активными свойствами. Следовательно, при повышении дозировки ферментного препарата (более 0,7%) параллельно с увеличением уровня депротеинизации ПСО увеличивается степень

гидролиза белка, что может способствовать интенсивному образованию пептидов, обладающих выраженными поверхностно–активными свойствами, при этом увеличивается степень потерь липидов в водной фракции. Изученная динамика отношения степени гидролиза к количеству ОА, переходящего в гидролизат (таблицы 3.5.1 и 3.5.2), подтверждает сделанные исследования по динамике накопления липидов в водной фракции (таблица 3.5).

Таким образом, было установлено, что дозировка ПГЗх в 0,7 % к массе белка ПСО при продолжительности гидролиза от 90 до 120 мин является рациональной, так как при данной дозировке фермента наблюдается относительно небольшое соотношение между количеством белковых производных с поверхностно-активными свойствами и количеством высвобождаемого доступного для эмульгирования жира.

Для точного определения рациональной продолжительности ферментативного гидролиза ПСО исследовалось распределение липидов, астаксантина и протеина по фракциям каждые 30 мин в течение 270 мин гидролиза (таблица 3.6). Дозировка ПГЗх составляла 0,7 % от массы белка, гидролиз осуществлялся без предварительной гидромеханической депротеинизации, с измельчением ПСО, продолжительность процесса 270 мин при температуре 37 ° С и гидромодуле (соотношение воды и ПСО) 4:1. Продолжительность перемешивания 2,5 мин. Центрифугирование продолжалось 15 мин при 4000 об/мин.

Таблица 3.6 – Показатели распределения компонентов в ОГ после центрифугирования в зависимости от продолжительности процесса гидролиза ПСО

Фракции	Вещества	Количество извлекаемых протеинов, липидов и каротиноидов от общего содержания в гидролизате, % / продолжительность процесса, мин									
		20 / 0	45 / 30	50 / 60	60 / 90	70 / 120	76 / 150	79 / 180	83 / 210	87 / 240	91 / 270
Жировая фракция	Протеин	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Липиды	81,6±1,2	82,3±2,2	83,6±2,3	83,4±3,5	87,8±0,4	85,4±3,9	84,6±2,4	84,1±2,1	80,0±3,6	86,8±2,3
	Астаксантин	47,3±2,1	49,0±1,6	49,2±1,4	49,1±2,1	49,0±2,1	50,1±2,5	51,1±3,2	51,8±2,6	53,0±2,4	57,1±3,1
Водная фракция	Протеин	1,4±0,2	2,1±0,3	2,3±0,3	2,9±0,3	2,9±0,3	3,5±0,6	5,5±0,3	8,4±1,1	15,5±1,1	18,4±1,1
	Липиды	2,3±0,6	3,4±1,1	3,6±0,5	4,1±0,6	4,2±0,4	7,4±0,9	8,5±1,2	8,8±0,7	8,6±0,3	8,6±0,4
	Астаксантин	4,4±0,2	4,5±1,2	4,4±0,6	4,5±0,3	4,9±0,8	4,3±0,3	6,7±1,1	7,1±0,4	8,4±0,5	8,5±0,6
Плотная фракция	Протеин	98,6±0,9	97,9±3,1	97,7±2,4	97,1±3,4	97,1±2,5	96,5±4,1	94,5±1,5	91,6±1,9	84,5±2,7	81,6±3,4
	Липиды	16,1±0,8	14,3±1,2	13,1±1,1	11,9±1,2	9,1±1,1	8,2±0,5	7,9±1,1	7,1±0,3	6,4±0,6	6,1±0,9
	Астаксантин	48,3±3,1	46,5±3,1	46,4±2,4	46,4±2,4	46,1±2,7	45,6±2,3	42,2±3,1	41,1±2,6	38,6±1,4	34,4±2,1

Результаты эксперимента показали прямую зависимость от продолжительности процесса гидролиза ПСО степень извлечения компонентов и их относительное распределение по фракциям (таблица 3.6).

В жировую фракцию переходит значительное количество липидов (81,6 % от извлеченного количества липидов) и астаксантина (47,3 % от извлеченного астаксантина) как на начальном этапе гидролиза, так и по его завершению (в 270 мин) (86,8 % липидов и 57,1 % астаксантина). Увеличение количества жировой фракции обуславливается дополнительным переходом липидов и астаксантина из плотной и водной фракции гидролизата за счет ферментативного разрушения нестабильных дисперсных образований (белково-липидных взвесей), образованных в начале гидролиза.

В водную фракцию в начальный момент времени (0 мин) перешло некоторое количество основных компонентов (протеина – 1,4 % от извлеченного количества, липиды – 2,3 % от извлеченного жира и астаксантина – 4,4 % от общего количества извлеченного астаксантина). Основное количество сухих веществ перешло в водную фракцию в течение первых 210 мин. По истечении 210 мин гидролиз характеризуется частичным или полным разрушением дисперсных образований с высвобождением липидов и их переходом в жировую фракцию. После 210 мин белковые компоненты в меньшей степени осаждаются центрифугированием или хитозаном. После разрушения эмульсии астаксантин переходит в жировую фракцию или окисляется, с образованием водорастворимых солей, не осаждаемых хитозаном.

В плотную фракцию в начале гидролиза (0 мин) перешло некоторое количество некоторых компонентов – протеина (до 98,6 % от общего количества извлеченных протеинов) и астаксантина (48,3 % от извлеченного астаксантина). В течение первых 120 мин наблюдалась незначительная потеря протеина (1,5 %) и астаксантина (2,2 %). Последующий гидролиз (от 120 до 270 мин) сопровождался интенсивной потерей протеина (15,5 %) и астаксантина (на 11,7 %) за счет увеличения степени гидролиза белкового субстрата под действием протеазы и переходом астаксантина в жировую или водную фракцию.

Учитывая зависимость между динамикой извлечения протеина, астаксантина, липидов и их распределением по фракциям после центрифугирования, рациональная продолжительность ферментативного гидролиза ПСО должна соответствовать – 120 мин, так как при дальнейшем гидролизе значительно ускоряются потери протеина, липидов и астаксантина, переходящих в водную фракцию гидролизата.

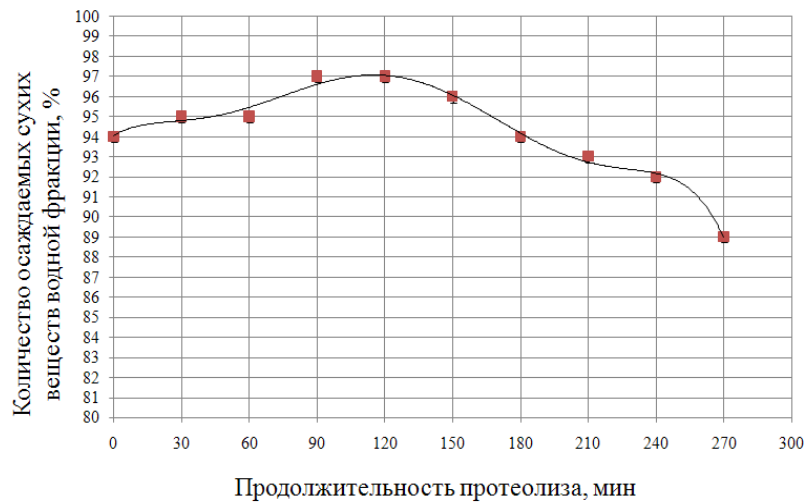
По завершении гидролиза до 20–35 % (протеина, астаксантина и липидов) не удастся перевести в целевые продукты. Для достижения необходимого выхода целевых

компонентов предлагается двухступенчатая ферментативная обработка ПСО (подразделы 3.2 и 3.3).

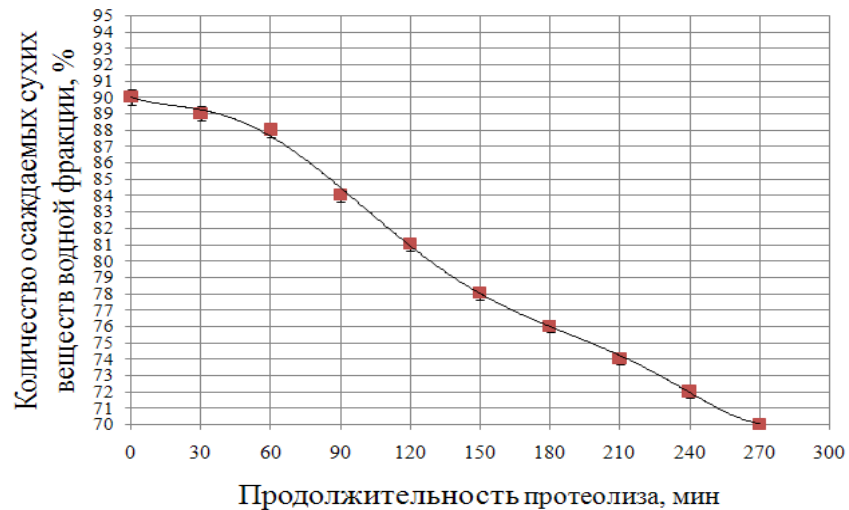
Для осаждения оставшихся в водной фракции гидролизата (полученной в результате смешивания нескольких водных фракций) протеина, астаксантина и липидов предлагается использовать осаждающий агент. Для проведения эксперимента использовались следующие осадители:

- хитозан с молекулярной массой, в концентрации 0,06 % от массы водной фракции гидролизата;
- ацетат цинка, концентрация которого составляла 0,01 % от массы водной фракции гидролизата;
- сульфат аммония в концентрации 0,01 % от массы водной фракции гидролизата;
- сульфат магния, концентрация которого составляла 0,01 % от массы водной фракции гидролизата.

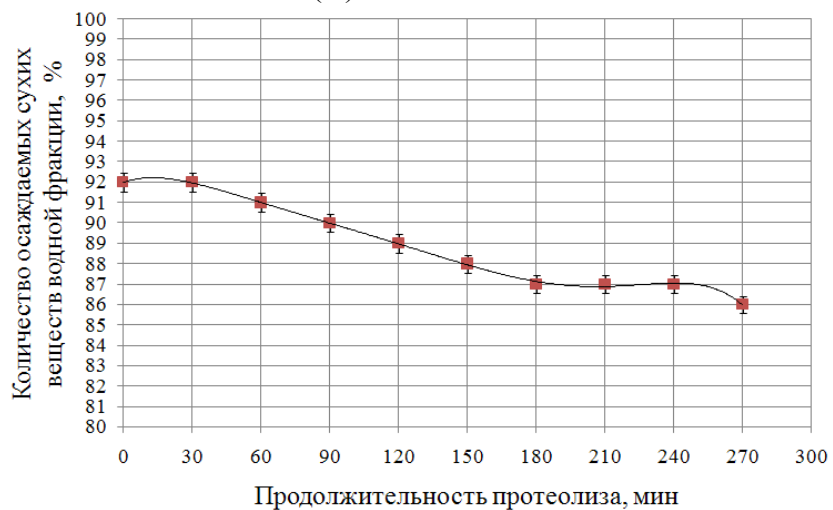
Выбор осаждающего агента обуславливался рекомендациями по осаждению сухих веществ белковых бульонов / гидролизатов – с учетом высоких осаждающих свойств и химической инертности к основным компонентам гидролизата (пункты 1.4.5 и 1.4.6). Гидролиз ПСО осуществлялся без предварительного гидромеханического удаления мягкого эпителия панциря в течение 270 мин, при дозировке фермента в 0,7 % от массы белка ПСО, гидромодуле 4:1 и скорости вращения ротора центрифуги 4000 об/мин в течение 15 мин (рисунок 3.7).



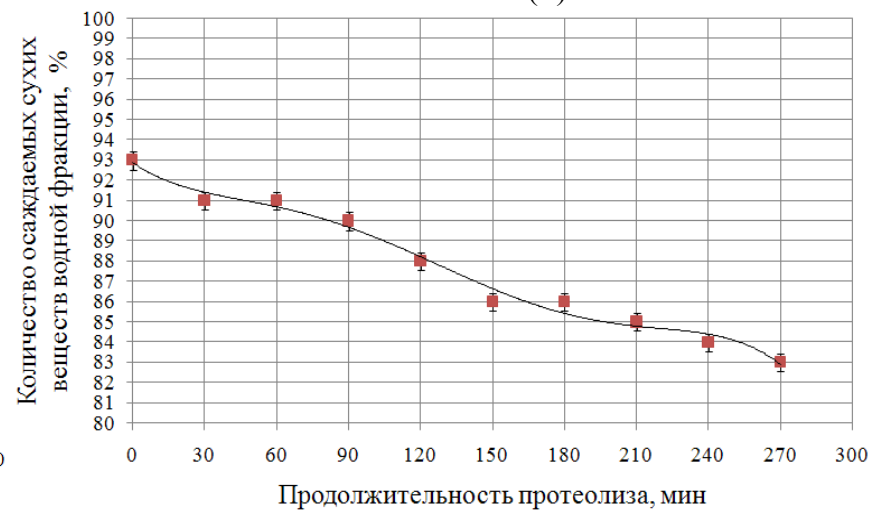
(А)



(Б)



(В)



(Г)

Рисунок 3.7 – Динамика осаждения сухих веществ водной фракции, полученной после фильтрования и центрифугирования, при использовании осаждающих агентов: хитозана (А), ацетата цинка (Б), сульфата аммония (В), сульфата магния (Г).

Использование осаждающих агентов позволяет достичь высоких уровней осаждения сухих веществ из водной фракции гидролизата (рисунок 3.7), находящихся в дисперсном или растворенном состоянии, для всех исследуемых образцов. Максимальный уровень осаждения в 97 % наблюдается при использовании хитозана при продолжительности процесса 120 мин, что объясняется переходом к этому моменту в водную фракцию достаточного количества липидов и протеинов, способных к седиментации под влиянием данного осадителя (рисунок 3.7). При продолжительности гидролиза от 120 до 270 мин наблюдается снижение уровня осаждения сухих веществ водной фракции [21, 103].

Применение ацетата цинка, сульфата аммония, сульфата магния, для осаждения сухих веществ водной фракции также демонстрирует хороший результат (до 93–94 % на 90-ой минуте). При дальнейшем продолжении гидролиза (от 90 до 270 мин) наблюдалось снижение уровня осаждения сухих веществ. Следовательно, применение данных осаждающих агентов для осаждения сухих веществ, находящихся в дисперсном или растворенном состоянии, менее эффективно по сравнению с хитозаном.

Для подбора рациональной дозировки осаждающего агента проведены сравнительные оценки уровней осаждения сухих веществ с учетом концентрации хитозана (таблица 3.7). Осаждение сухих веществ водной фракции гидролизата осуществлялось после 120 мин гидролиза ПСО, без предварительной гидромеханической депротеинизации, при температуре 37 °С и гидромодуле (соотношение воды и ПСО) 4:1. Центрифугирование продолжалось 15 мин при 4000 об/мин. Дозировка ПГЗх составляла 0,7 % от массы белка ПСО.

Таблица 3.7 – Влияние концентрации хитозана на степень осаждения сухих веществ водной фракции

Количество хитозана на 100 г. водной фракции гидролизата, %	Количество осажденных сухих веществ из водной фракции гидролизата, %	Остаточное количество сухих веществ в 100 г водной фракции, %
0,01	40	77
0,02	68	32
0,03	85	15
0,04	92	8
0,05	97	3
0,06	97	3

Сравнительная оценка показала, что при концентрации хитозана в 0,06 и 0,05 % от массы водной фракции, достигается максимальный уровень осаждения сухих веществ в 97 % (таблица 3.7). Дальнейшее понижение дозировки приводит к уменьшению

количества осаждаемых сухих веществ, следовательно, концентрация хитозана в 0,05 % от массы водной фракции является рациональной (рисунок 3.8).



А



Б

Рисунок 3.8 – Осаждение хитозаном (дозировка в 0,05 %) сухих веществ водной фракции гидролизата: А – отфильтрованная водная фракция гидролизата до осаждения; Б – отфильтрованная водная фракция гидролизата после осаждения

Установленная концентрация хитозана позволяет осаждать до 97 % сухих веществ, что подтверждается визуально наблюдаемым увеличением прозрачности водной фракции (рисунок 3.8).

3.3.2 Определение продолжительности вакуумной сушки плотной фракции и режимов инактивации протосубтилина ГЗх

Выделенная плотная фракция (белковый гидролизат) в своем составе содержит активные протеазы ПГЗх (как нейтральные, так и в меньшем количестве щелочные), что в дальнейшем может негативно отразиться на хранимоспособности конечного продукта (комбинированных снеков).

Продолжительность тепловой инактивации фермента определялась исходя из анализа:

– влияния температуры на активность ПГЗх, оцениваемую по интенсивности накопления ФТА во время процесса инактивации;

– различий в уровне остаточного содержания астаксантина в плотной фракции при различных режимах инактивации фермента.

Технологический процесс тепловой инактивации ПГЗх осуществлялся при минимальной циркуляции воздуха в специализированном тепловом шкафу при следующих температурах – 65 °С, 70 °С, 75 °С, 80 °С, 85 °С и 90 °С. Для ускорения процесса инактивации фермента плотная фракция была нанесена равномерно тонким слоем не более 2 мм на металлическую пластину. Результаты эксперимента отображены на рисунке 3.9.

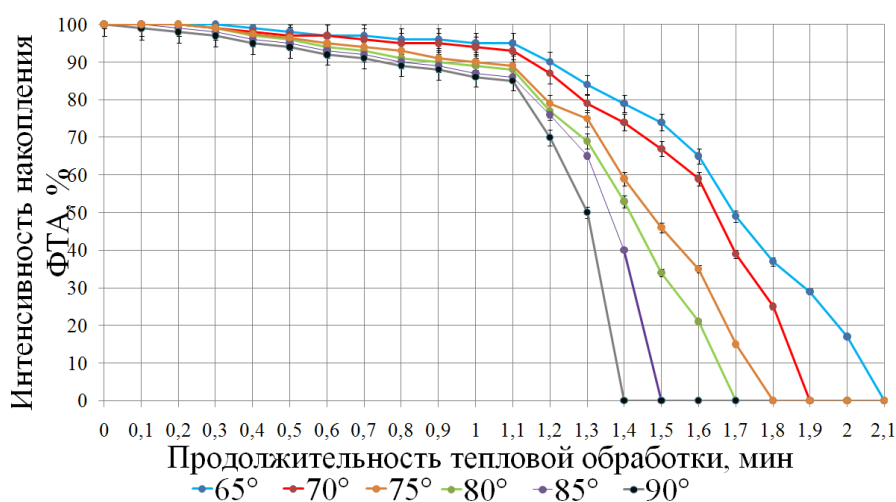


Рисунок 3.9 – Динамика накопления ФТА в белковом гидролизате (плотной фракции) при тепловой инаktivации фермента

Снижение скорости накопления продуктов гидролиза (белка) может свидетельствовать о инаktivации протеазы. При минимальной температуре в 65 °С точка инаktivации ПГЗх достигается в течение 2,1 мин, а при максимальной температуре в 90°С полное инаktivация ПГЗх достигается в течение 1,4 мин с момента начала процесса (рисунок 3.9).

Для подбора рациональной продолжительности и температуры инаktivации фермента в качестве основополагающего показателя использовалось отношение количества астаксантина до и после обработки плотной фракции (рисунок 3.10).



Рисунок 3.10 – Влияние тепловой обработки на концентрацию астаксантина в белковом гидролизате (плотной фракции)

Продолжительная тепловая инактивации ПГЗх гидролизата при минимальной температуре в 65 °С ведет к потере 18 % астаксантина. Инактивация же при достаточно высокой температуре в 90 °С, несмотря на сокращение продолжительности процесса, приводит к потере 11 % астаксантина. Рациональная продолжительность процесса инактивации соответствует следующим параметрам: температуре 85 °С в течение 1,5 мин. При данных условиях по достижении точки инактивации ПГЗх концентрация астаксантина находится в пределах 94 % от начальной концентрации (рисунок 3.10).

Для обезвоживания белкового гидролизата предлагается использовать вакуумную сушку (подраздел 1.4).

Процесс сушки белкового гидролизата проводился в соответствии с паспортными характеристиками вакуумной установки и рекомендациями по обезвоживанию белковых паст и рыбных гидролизатов [30]. Процесс обезвоживания осуществлялся при температуре источника ИК–излучения (нагревающей пластины) 80 – 85 °С и давлении в 9 кПа. Для равномерного удаления воды в качестве емкости использовались специальные металлические формы, толщина слоя нанесенного гидролизата соответствовала 6 мм (не более). Температура гидролизата в течение всей сушки варьировалась в пределах от 11 °С до 21 °С без учета начальной температуры (рисунок 3.11). Вакуумная сушка осуществлялась на опытно–промышленной установке ТА–1.

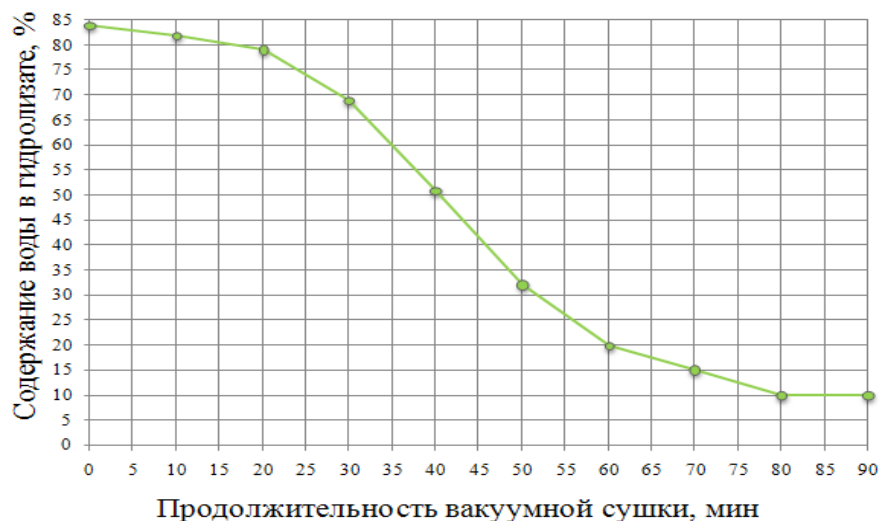


Рисунок 3.11 – Динамика вакуумного обезвоживания (сушки) белкового гидролизата

По результатам исследований установлено, что рациональная продолжительность сушки соответствует 80 мин (обезвоживание до 10 % воды). Потеря астаксантина при вакуумном обезвоживании в этих условиях не наблюдалась, несмотря на фиксируемое повышение температуры в продукте до 21 °С в течение последних 10 мин обезвоживания (рисунок 3.11).

3.3.3 Технология пищевого белкового гидролизата

Данные, полученные ранее в подразделе 3.2, показывают, что для более полной экстракции протеина, каротиноидов (астаксантина) и липидов из ПСО предполагается проведение ферментативного гидролиза в два этапа.

Разработанная технология (рисунок 3.12) основывается на трехкратной депротеинизации: одной бесферментативной (гидромеханической) и следующих за ней двух с использованием фермента. ПСО измельчают, гидромеханическим способом отделяют белково-жировую суспензию, после чего оставшийся твердый остаток подвергают двукратному ферментированию. Первая ступень гидролиза продолжается в течение 120 мин, при температуре 37 °С, гидромодуле 4:1, дозировке ПГЗх 0,7 % от массы белка ПСО (0,5 – 0,7 г на 1 кг ПСО), оставшейся после предварительной гидромеханической депротеинизации. Продолжительность центрифугирования ОГ – 15 мин при 4000 об/мин. Вторая ступень гидролиза проводится при тех же условиях, что и первая. Дозировка ПГЗх составила 0,7 % от массы оставшегося в ПСО белка (0,3–0,4 г на 1 кг ПСО). Вакуумное обезвоживание плотной фракции гидролизата осуществлялось

80 мин при давлении в 9 кПа. Осаждение сухих веществ декантированного гидролизата осуществлялось раствором хитозана (0,5 г хитозана для 1 кг декантированного гидролизата, разводится в соотношении 1:4 в растворе воды и щавельной кислоты (1,59 мг на 1 г воды) с рН 5,0 – 5,5).

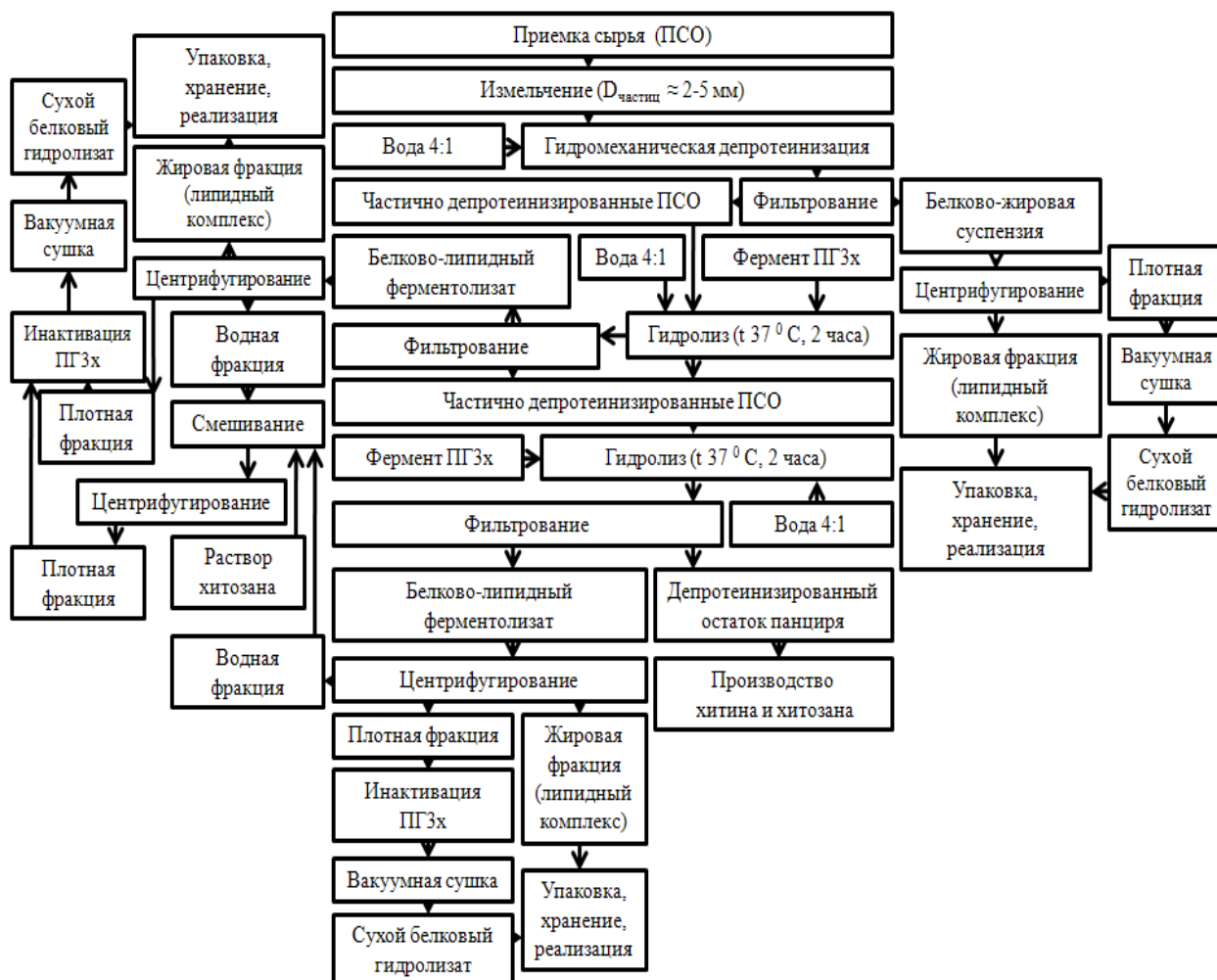


Рисунок 3.12– Технология сухого белкового гидролизата

Подробное описание данной технологии приведено в технологических инструкциях к ТУ 10.89.14–295–00472093–2018166 и ТУ10.20.31–296–00472093–2018 (Приложение Б и Г)

ПСО измельчаются до размеров от 2 до 5 мм. Измельчение панцирного субстрата позволяет улучшить экстракцию основных компонентов ПСО (липидов, частично протеина и астаксантина) (подраздел 3.2).

Предварительное частичное гидромеханическое удаление мягкого эпителия панциря (технологический этап гидромеханической депротенинизации) проводится в течение 5 мин при гидромодуле (соотношение воды и ПСО) 4:1 и температуре воды 10 °С (подраздел 3.2). Полученная суспензия центрифугируется.

Первая ступень гидролиза продолжается 120 мин при 37 °С без доступа света и при естественной циркуляции воздуха в термостате. По завершении первой ступени гидролиза ПСО полученный ферментолитат пропускается через железное сито с диаметром ячейки не более 1 мм. Панцирный фильтрат направляется на вторую ступень гидролиза. Отфильтрованный от панцирей гидролизат подвергается центрифугированию в течение 15 мин при 4000 об/мин. При центрифугировании происходит разделение гидролизата на липидную / (жировую) фракцию, белковую (плотную) фракцию и жидкую (водную) фракцию. Инактивация протеазы гидролизата осуществляется в течение 1,5 мин при температуре 85 °С. Полученная белковая фракция (плотная) подвергается вакуумному обезвоживанию в течение 80 мин с последующей упаковкой.

Частично депротеинизированные ПСО повторно гидролизуются при дозировке ПГЗх в 0,7 % от оставшейся после первой ступени массы белка ПСО при следующих условиях: продолжительность 120 мин при 37 °С, гидромодуль 4:1.

По завершении второй ступени гидролиза ПСО полученный гидролизат пропускается через металлическое сито с диаметром сетки не более 1 мм. Частично депротеинизированный хитино-минеральный субстрат может быть использован в дальнейшем производстве хитина / хитозана. Полученный гидролизат подвергается центрифугированию 15 мин при 4000 об/мин, с последующим разделением на фракции. Параметры инактивации протеазы и вакуумное обезвоживание плотной фракции равнозначны, как и для первой ступени гидролиза.

Сухие вещества трех водных фракций гидролизата, не перешедшие ни в жировую, ни в плотную фракцию при центрифугировании, осаждаются раствором хитозана (с концентрацией 0,05 % от массы водной фракции, гидромодуль 4 : 1). Применение хитозана в качестве осаждающего агента позволяет осадить из водной фракции каротинопротеины, липиды и частично протеин, перешедший в состав дисперсных образований или в растворенное состояние (рисунок 3.13). Осажденная хитозаном плотная фракция нагревается (инактивация ПГЗх) и обезвоживается при тех же режимах, что и плотная фракция первой ступени.



Рисунок 3.13 – Осажденный хитозаном и обезвоженный белковый гидролизат (300-кратное увеличение)

Результаты электронно-оптических исследований (рисунок 3.13) показали, что при добавлении хитозана в водную фракцию происходит образование крупных белково-липидных агломераций, осаждаемых центрифугированием.

Предложенная технология позволяет извлекать из ПСО значительную часть протеина, астаксантина и липидов (таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Степень суммарного (в виде белковых гидролизатов и липиднокаротиноидного комплекса) извлечения органических компонентов на различных этапах технологического процесса переработки ПСО

Извлекаемые компоненты	Массовая доля компонента, % от начального содержания в ПСО		
	Гидромеханическая депротеинизация	Первая ступень гидролиза	Вторая ступень гидролиза
Протеин	25,8 ± 3,2	34,9 ± 2,4	24,8 ± 2,1
Липиды	53,1 ± 2,1	25,5 ± 0,5	15,6 ± 0,9
Астаксантин	35,6 ± 3,2	31,7 ± 1,5	29,8 ± 1,6

Исследование характера распределения компонентов на различных технологических этапах гидролиза показало, что наибольший выход липидов наблюдается во время гидромеханической обработки – до 53,1 % от общего содержания в ПСО, а максимальное извлечение протеинов из ПСО происходит на первой ступени ферментативного гидролиза – 34,9 % (таблица 3.8).

Выделенный и обезвоженный пищевой белковый гидролизат представлен в виде однородного порошка коричнево-оранжевого цвета со слабовыраженным запахом вяленой креветки (рисунок 3.14)



Рисунок 3.14 – Обезвоженный пищевой белковый гидролизат, полученный после первой ступени гидролиза, в вакуумной полиэтиленовой упаковке

При использовании двухступенчатой технологии гидролиза ПСО вырабатывается четыре типа белковых гидролизата (плотная фракция):

- белковый гидролизат, полученный после центрифугирования суспензии (БГ 1);
- белковый гидролизат, полученный после центрифугирования ферментализата, первой ступени гидролиза (БГ 2);
- белковый гидролизат, полученный после центрифугирования ферментализата, второй ступени гидролиза (БГ 3);
- белковый гидролизат, полученный в результате осаждения хитозаном сухих веществ водных фракций после центрифугирования (БГ 4).

Для установления пищевой ценности проведен анализ химического состава образцов белковых гидролизатов (таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Химический состав белковых гидролизатов

Показатели	Содержание в БГ, %				
	Смешанный белковый гидролизат	Белковый гидролизат суспензии (БГ1)	Белковый гидролизат первой ступени (БГ2)	Белковый гидролизат второй ступени (БГ 3)	Белковый гидролизат, осажденный хитозаном (БГ 4)
Протеин	80,90 ± 3,21	80,80±3,42	81,10 ± 3,61	81,30 ± 4,11	80,90 ± 2,12
Липиды	2,40 ± 0,24	2,80 ± 0,21	2,20 ± 0,12	1,90 ± 0,15	2,70 ± 0,31
Минеральные вещества	6,20 ± 0,21	5,90 ± 0,22	6,20 ± 0,31	6,30 ± 0,21	6,10 ± 0,16
Вода	10,01 ± 0,12	10,00 ± 0,11	10,02 ± 0,11	10,01 ± 0,15	10,03 ± 0,12
Астаксантин	0,009±0,001	0,010±0,002	0,009±0,001	0,008±0,001	0,011±0,002

Анализ данных таблицы 3.9 показал, что все образцы БГ содержат астаксантин (от 8×10^{-3} % до 11×10^{-3} % общей массы). Обезвоженные белковые гидролизаты, выработанные на первой и второй ступени, характеризуются содержанием астаксантина 9×10^{-3} % и 8×10^{-3} % общей массы.

Белковые гидролизаты, полученные из водных фракций и суспензии, содержат от 2,7 % до 2,8 % липидов, однако и содержание астаксантина в них выше по сравнению с гидролизатами первой и второй ступени, что объясняется большим количеством растворенных в липидах каротиноидов.

Белковые гидролизаты, полученные из водных фракций, характеризуются большим содержанием липидов (до 2,8 %). Однако содержание каротиноидов (астаксантина) на 10 % выше по сравнению с гидролизатами первой и второй ступени, что объясняется большим количеством связанных или растворенных в липидах каротиноидов в составе дисперсных образований (эмульсий) при осаждении их хитозаном. Также каротиноиды переходят в состав липопротеиновых комплексов, перешедших в осадок при осаждении их хитозаном.

Предложенная технология также позволяет выделять три типа ЛКК (ЛКК 1 – жировая фракция, полученная после центрифугирования суспензии, ЛКК 2 – жировая фракция, полученная после центрифугирования ферментолизата первой ступени гидролиза, ЛКК 3 – жировая фракция, полученная после центрифугирования ферментолизата второй ступени гидролиза) с высокой концентрацией астаксантина (таблица 3.10) и омега–3 кислот.

Таблица 3.10 – Сравнительная характеристика выделяемых жировых фракций и крилевого жира

Вещества	Показатели для крилевого жира ²	ЛКК 1	ЛКК 2	ЛКК 3
Содержание астаксантина, мкг / г экстракта	≥ 110	$150 \pm 3,5$	$160 \pm 5,3$	$110 \pm 4,3$
Содержание омега–3 кислот, г / 100 г экстракта ¹	≥ 30	31,2	31,2	31,2
Содержание фосфолипидов, г / 100 г экстракта ¹	≥ 40	35,8	35,8	35,8

¹ – справочник по химическому составу и технологическим свойствам водорослей, беспозвоночных и морских млекопитающих, 1999 г

² – реестр биологически активных добавок № 77.99.11.У.1200.3.10

Выделяемые ЛКК (таблица 3.10) по содержанию альфа-линоленовой, докозагексаеновой, эйкозапентаеновой омега–3 кислот, астаксантина и фосфолипидов приближены к крилевому жиру и, следовательно, могут быть использованы при изготовлении пищевых биологически активных добавок.

Дальнейшие исследования проводились с БГ, полученным в результате равнопропорционального (25 : 25 : 25 : 25) смешивания всех четырех образцов БГ. Однако каждый из выработанных БГ может использоваться при производстве пищевого продукта, в зависимости от особенностей его химического состава и требуемых товароведческих характеристик.

При хранении обезвоженного БГ с учетом комнатной температуры в 21 ± 2 °С и относительной влажности не более 70 % в качестве основополагающего показателя использовалась концентрация астаксантина. Для эксперимента использовалась вакуумная и обычная упаковка (непрозрачная пластиковая полиэтиленовая) (рисунок 3.15). Хранение образцов осуществлялось в недоступном для света месте, при естественной циркуляции воздуха.

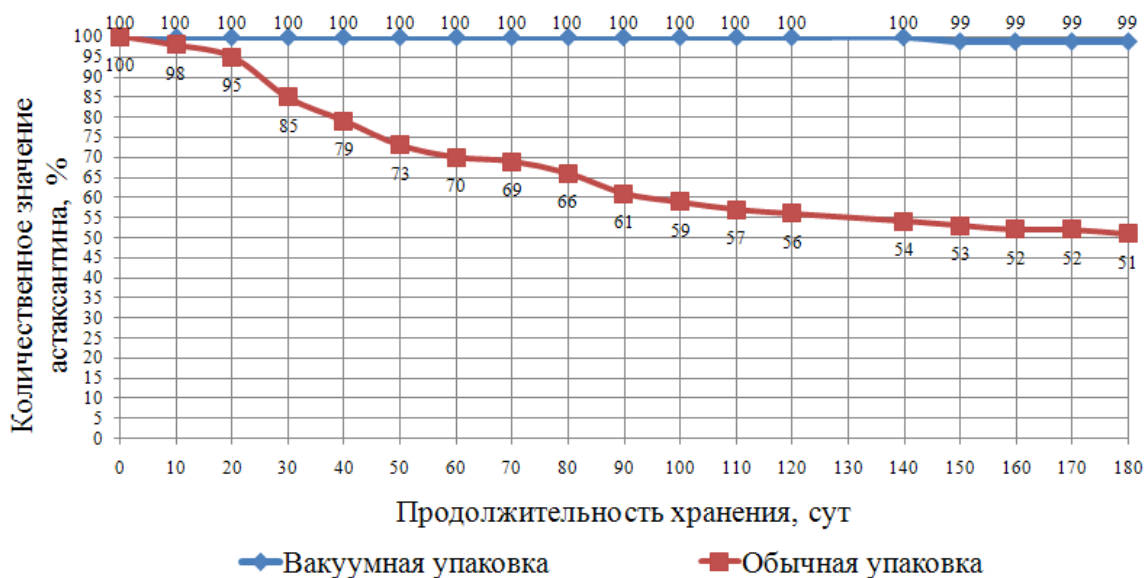


Рисунок 3.15 – Влияние продолжительности хранения и типов упаковки на концентрацию астаксантина

При использовании вакуумной упаковки потери астаксантина не наблюдаются в течение 120 сут хранения (рисунок 3.15). Небольшие изменения в 1 % от начальной концентрации фиксируются после четырехмесячного хранения (от 120 до 180 сут).

Использование обычной (невакуумной) упаковки позволяет сохранять начальную концентрацию астаксантина в течение 10 сут. Последующее безвакуумное хранение ведет к интенсивной потере астаксантина.

При краткосрочном хранении БГ (до 20 сут) рационально использовать обычную (невакуумную) упаковку. Однако при более продолжительном хранении рекомендуется использовать упаковку под вакуумом при соответствующих условиях хранения – естественная циркуляция воздуха, температура в 21 ± 2 °С при отсутствии света.

Проведены исследования микробиологической безопасности БГ в начале и через 180 сут хранения в вакуумной упаковке при температуре в 21 ± 2 °С и относительной влажности не более 70 % (таблица 3.11). В качестве основополагающих значений использовались санитарно-эпидемиологические показатели для сушеной рыбной продукции из уловов водных биологических ресурсов морского промысла – гидролизат из мидий (ТР ТС 021/2011, ТР ЕАЭС 040/2016).

Таблица 3.11 – Микробиологические показатели белкового гидролизата

Наименование показателя	Норма, не более	Показатели в начале хранения	Показатели через 180 сут
Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), КОЕ/г (см ³), не более	5,0x10 ³	0,9 × 10 ²	4,0 × 10 ³
Бактерии группы кишечных палочек (колиформы) (БГКП), не допускаются в массе продукции (г)	1,0	Не обнаружены	Не обнаружены
E.Coli, в 1,0 г.	Не допускаются	Не обнаружены	Не обнаружены
ПЭБ (в т.ч. сальмонеллы), в 25 г.	Не допускаются	Не обнаружены	Не обнаружены
S. aureus, не допускаются в 1 г. продукции	1,0	Не обнаружены	Не обнаружены
Сульфитредуцирующие клостридии, не допускаются в массе продукции (г)	Не допускаются	Не обнаружены	Не обнаружены

По основным микробиологическим показателям образец соответствует установленным нормам ТР ЕАЭС 040/2016 как в начале хранения, так и по завершению 180 сут (таблица 3.11).

Для подтверждения основных показателей химической безопасности были проведены сравнительные исследования по соответствию получаемого белкового гидролизата основным показателям безопасности (ТР ТС 021/2011) для сушеной рыбной продукции из уловов водных биологических ресурсов морского промысла – гидролизата из мидий (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Показатели содержания токсических элементов в обезвоженном белковом гидролизате

Наименование показателей	Допустимые уровни, не более	Показатели белкового гидролизата
Свинец, мг/кг	1,00	0,12
Кадмий, мг/кг	0,200	0,053
Мышьяк, мг/кг	5,0	0,8
Ртуть, мг/кг	0,500	0,049
Цезий-137, бк/кг	Не нормируется	менее 22,0
Стронций-90, бк/кг	260	менее 4

Содержание токсичных элементов в БГ не выходит за установленные значения технического регламента таможенного союза (ТР ТС 021/2011) для сушеной рыбной

продукции из уловов водных биологических ресурсов морского промысла – гидролизата из мидий (таблица 3.12).

Дальнейшие эксперименты по установлению пищевой ценности получаемого обезвоженного белкового гидролизата включал в себя исследования аминокислотного состава (таблица 3.13) в сопоставлении с показателями ФАО / ВОЗ ²⁰¹⁵ по идеальному белку (рисунок 3.16).

Таблица 3.13 – Аминокислотный состав белкового гидролизата

Группа	Аминокислоты	Индекс	Результаты испытаний г/100 г белка
Основные	Аргинин (Arg)	Arg	3,77
Ароматические	Тирозин (Tyr)	Tyr	1,65
Ароматические	Фенилаланин (Phe)	Phe	2,41
Ароматические	Гистидин (His)	His	1,61
Моноаминовые	Лейцин (Leu)	Leu	2,70
Монокарбоновые	Изолейцин (Ile)	Ile	1,30
Серосодержащие	Метионин (Met)	Met	1,53
Моноаминовые – монокарбоновые	Валин (Val)	Val	3,32
Неполярные	Пролин (Pro)	Pro	2,36
Серосодержащие	Треонин (Thr)	Thr	2,81
Серосодержащие	Серин (Ser)	Ser	2,73
Моноаминовые – монокарбоновые	Аланин (Ala)	Ala	3,04
Моноаминовые – монокарбоновые	Глицин (Gly)	Gly	2,81
Дикарбоновые	Аспарагиновая кислота–Аспарагин (Asp-Asn)	Asp-Asn	8,22
Дикарбоновые	Глутаминовая кислота–Глутамин (Glu–Gln)	Glu-Gln	7,23
Ароматические	Триптофан (Trp)	Trp	0,62
Основные	Лизин (Lys)	Lys	4,62
Серосодержащие	Цистин (Cys-Cys)	Cys-Cys	1,70

В БГ (таблица 3.13) присутствуют все незаменимые аминокислоты (НАК). Для установления степени сбалансированности аминокислотного состава гидролизата были сопоставлены НАК БГ с показателями НАК идеального белка ФАО / ВОЗ ²⁰¹⁵ (рисунок 3.16). Потенциальная биологическая ценность белка БГ находится на уровне 67 %.

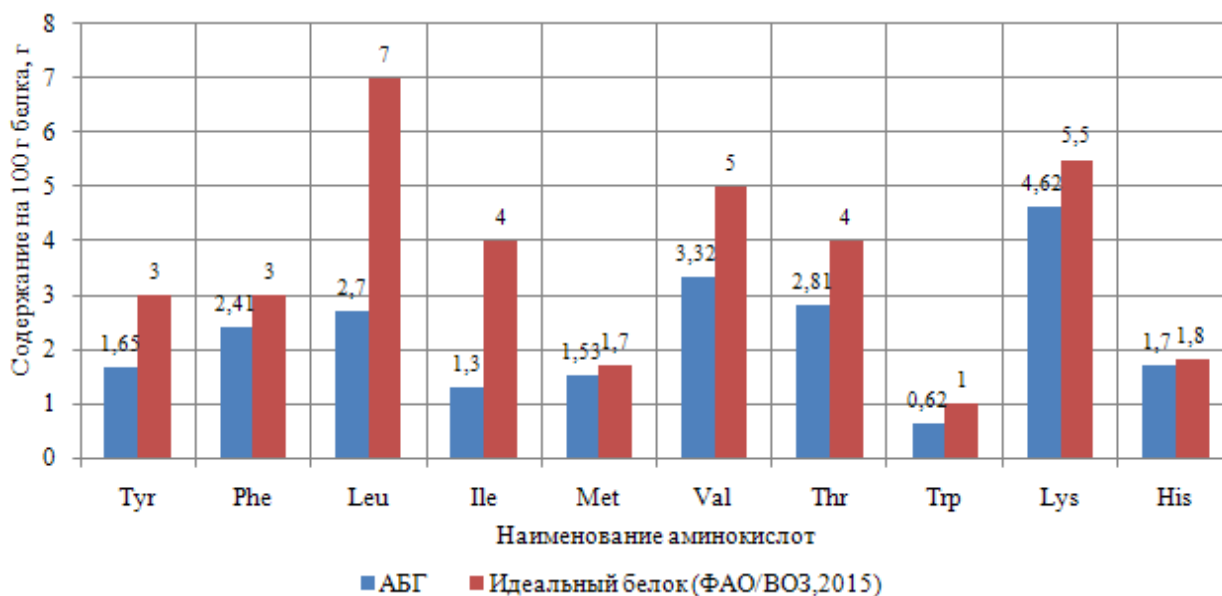


Рисунок 3.16 – Соотношение незаменимых аминокислот БГ и идеального белка

Применение предложенного способа комбинированной гидромеханической и двухстадийной ферментативной обработки ПСО позволяет получить БГ с низкой степенью гидролиза при условии содержания жира не более 3 %, рекомендованного FAO для белковых концентратов категории В.

3.4 Обоснование технологии комбинированных снеков

При дальнейшем применении обезвоженного белкового гидролиза в качестве основного компонента рецептуры необходимо использовать комбинированные композиции с растительными высокобелковыми ингредиентами (бобовыми). Подобное решение позволит создать снеки невысокой ценовой категории, а также дополнительно обогатить конечный продукт незаменимыми аминокислотами, сложными углеводами, пищевыми волокнами, флавоноидами, а также токоферолами (подраздел 1.7). Применение в рецептуре комбинированного продукта растительных (бобовых) компонентов также объясняется вкусоароматической сочетаемостью некоторых бобовых культур с белковыми гидролизатами, полученных при комплексной переработке ВБР [17, 45].

3.4.1 Подбор рационального соотношения компонентов рецептуры снеков

В рамках диссертационных исследований было разработано три типа комбинированных снеков с разным соотношением растительного (с зеленой чечевицей, красной и белой фасолями (ГОСТ 7066-77, ГОСТ 7758-75)) и обезвоженного белкового гидролизата.

При разработке технологии снеков необходимо учитывать, что астаксантин должен подвергаться меньшей тепловой нагрузке. Вследствие чего предлагается проводить предварительную тепловую обработку (варку) растительного сырья, с последующим его измельчением, охлаждением и смешиванием с гидролизатом, а необходимые структурные значения снеков будут достигнуты за счет последующего применения вакуумной сушки полученной смеси. Процесс вакуумной сушки осуществлялся при температуре источника ИК-излучения (нагреваемой пластины) 80 – 85 °С и давлении 9 кПа в вакуумной установке.

Подбор рационального соотношения компонентов рецептуры осуществлялся исходя из органолептических оценок по таким показателям, как вкус, запах, консистенция и цвет (таблица 3.14). Оценки снеков проводились по разработанной пятибалльной шкале, с учетом коэффициента значимости – вкус 0,35; аромат 0,20; цвет 0,25; консистенция 0,20 (Приложение Л). Концентрация основных компонентов выражалась из расчета на сухое вещество.

Таблица 3.14 – Органолептическая оценка снеков, изготовленных при различных концентрациях БГ в рецептуре

Количество белкового гидролизата, % от массы сушеного п/ф	Оценки основных органолептических показателей снеков, балл				Оценки основных органолептических показателей снеков с учетом коэффициента значимости, балл				
	Консис- тенция	Запах	Вкус	Цвет	Консис- тенция	Запах	Вкус	Цвет	Общая оценка
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Подбор рационального соотношения компонентов рецептуры для снеков с добавлением белой фасоли									
5	1,00	3,00	1,00	1,00	0,20	0,60	0,35	0,25	1,40
10	1,00	3,00	1,50	2,00	0,20	0,60	0,53	0,50	1,83
15	1,50	3,00	2,00	2,50	0,30	0,60	0,70	0,63	2,23
20	2,00	3,00	2,00	3,00	0,40	0,60	0,70	0,75	2,45
25	2,50	3,50	3,00	3,50	0,50	0,70	1,05	0,88	3,13
30	3,50	4,00	3,50	4,00	0,70	0,80	1,23	1,00	3,73
35	4,00	4,00	4,00	4,50	0,80	0,80	1,40	1,13	4,13
40	4,00	4,50	5,00	4,50	0,80	0,90	1,75	1,13	4,58
45	4,00	4,50	5,00	4,50	0,80	0,90	1,75	1,13	4,58
50	5,00	5,00	5,00	5,00	1,00	1,00	1,75	1,25	5,00
55	4,50	5,00	5,00	4,00	0,90	1,00	1,75	1,00	4,65
Снеки с добавлением красной фасоли									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	1,00	1,00	1,00	2,00	0,20	0,20	0,35	0,50	1,25
10	1,50	1,00	2,00	2,00	0,30	0,20	0,70	0,50	1,70
15	2,00	2,00	2,00	2,00	0,40	0,40	0,70	0,50	2,00
20	2,50	3,00	2,00	2,50	0,50	0,60	0,70	0,63	2,43
25	3,00	3,50	3,00	2,50	0,60	0,70	1,05	0,63	2,98
30	3,50	4,00	3,50	3,00	0,70	0,80	1,23	0,75	3,48
35	4,00	4,00	4,00	3,50	0,80	0,80	1,40	0,88	3,88
40	4,50	4,50	4,50	4,00	0,90	0,90	1,58	1,00	4,38
45	5,00	5,00	4,50	4,50	1,00	1,00	1,58	1,13	4,70
50	5,00	5,00	5,00	5,00	1,00	1,00	1,75	1,25	5,00
55	5,00	4,50	4,50	5,00	1,00	0,90	1,58	1,25	4,73
Снеки с добавлением зеленой чечевицы									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	1,00	1,00	1,50	1,00	0,20	0,20	0,53	0,25	1,18
10	1,50	1,00	1,50	2,00	0,30	0,20	0,53	0,50	1,53
15	2,00	2,00	1,50	2,00	0,40	0,40	0,53	0,50	1,83
20	2,50	2,00	2,00	2,50	0,50	0,40	0,70	0,63	2,23
25	3,00	2,00	3,00	2,00	0,60	0,40	1,05	0,50	2,55
30	4,00	4,00	4,00	4,00	0,80	0,80	1,40	1,00	4,00
35	4,50	4,00	4,00	4,00	0,90	0,80	1,40	1,00	4,10
40	4,50	4,00	4,50	4,00	0,90	0,80	1,58	1,00	4,28
45	5,00	4,50	4,50	4,50	1,00	0,90	1,58	1,13	4,60
50	5,00	5,00	5,00	5,00	1,00	1,00	1,75	1,25	5,00
55	5,00	5,00	4,50	4,50	1,00	1,00	1,58	1,13	4,70

Полученные результаты показали, что все три образца снеков получили максимальные органолептические оценки при концентрации белкового компонента равной 50 % от общего количества сухих веществ (таблица 3.14). Следовательно, для проектируемых снеков рекомендуемое соотношение БГ к растительному компоненту – 50 % на 50 % (из расчета на сухое вещество).

Для подбора рациональной продолжительности сушки исследовались три образца снеков (при соотношении растительного сырья и БГ 50 на 50 из расчета на сухое вещество). Форма полуфабриката соответствовала круглой пластине с радиусом 3,5 см и толщиной 4 мм (рисунок 3.17).

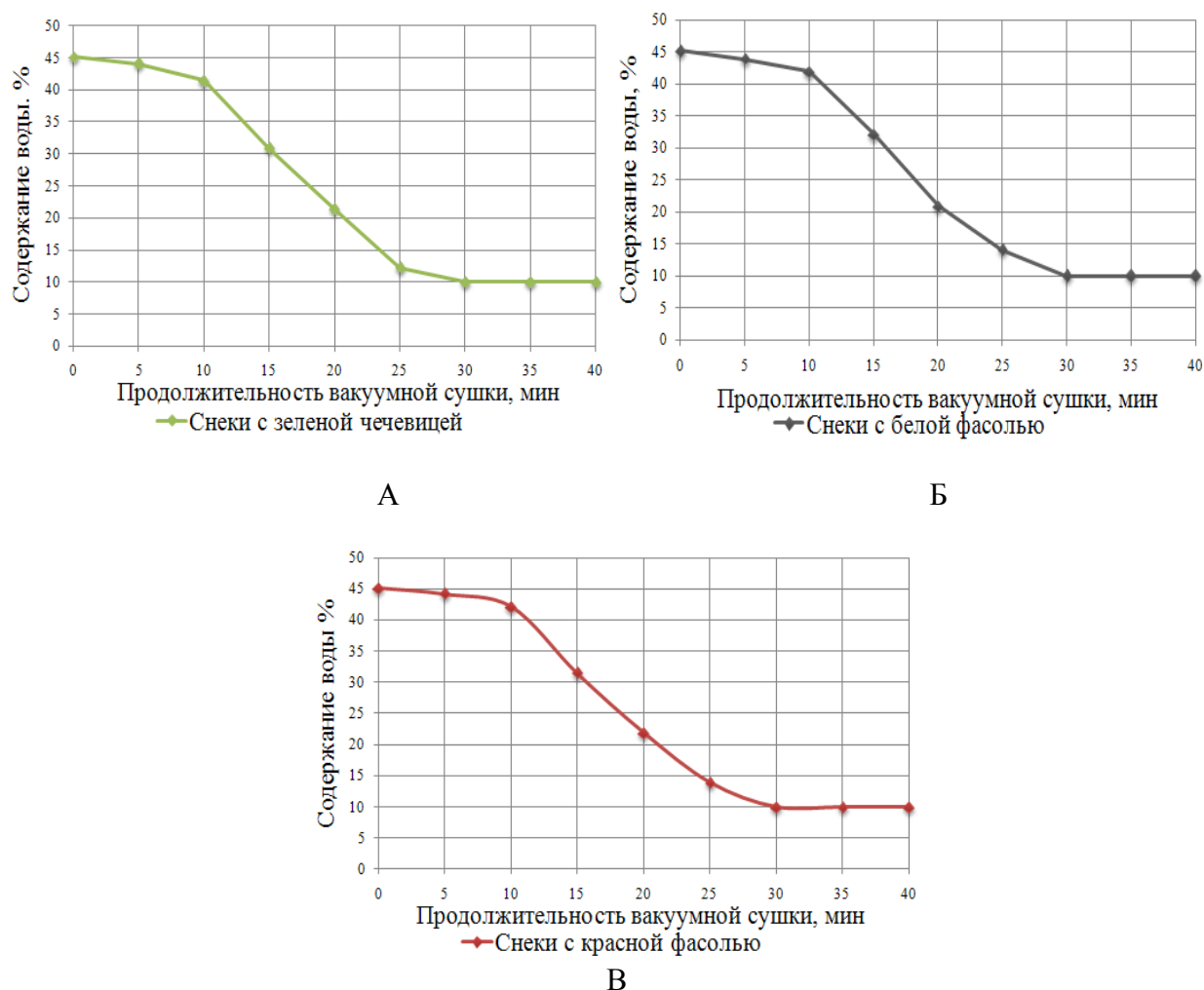
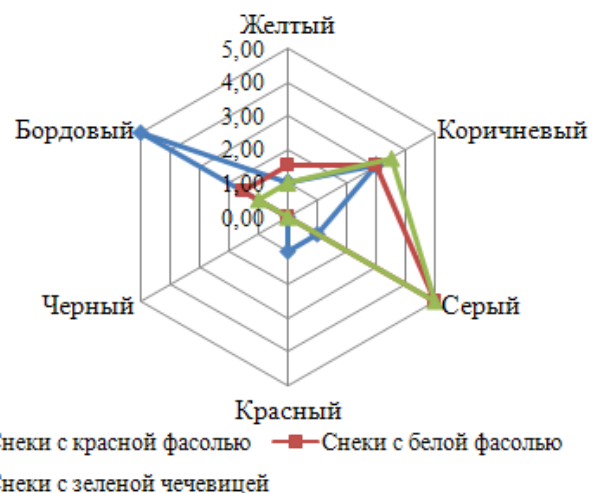


Рисунок 3.17 – Динамика вакуумной сушки комбинированных снеков: А – с зеленой чечевицей, Б – с белой фасолью, В – с красной фасолью

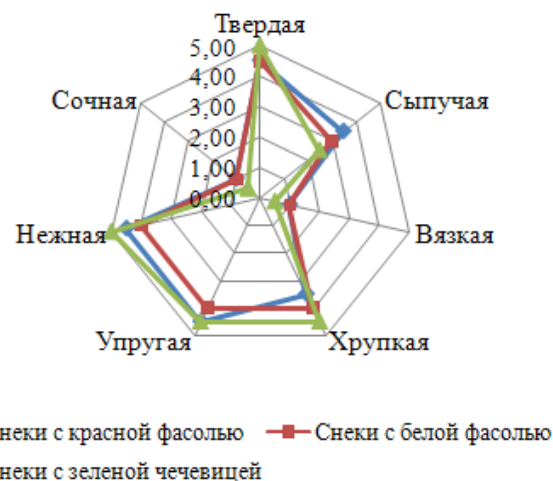
Из анализа кривой вакуумной сушки установлено (рисунок 3.17), что рациональная продолжительность процесса обезвоживания, в течение которого достигается содержание

воды в 10 %, соответствует 30 мин. При конечном содержании воды в 10 % консистенция продукта не была излишне хрупкой или твердой.

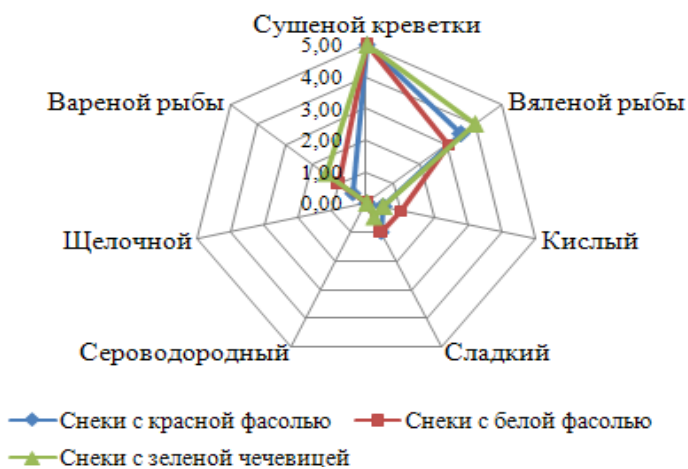
Дальнейшие исследования органолептических показателей качества разработанных снеков включали оценку профильным методом основных критериев запаха, вкуса, консистенции и цвета по пятибалльной шкале (Приложение К) (рисунок 3.18).



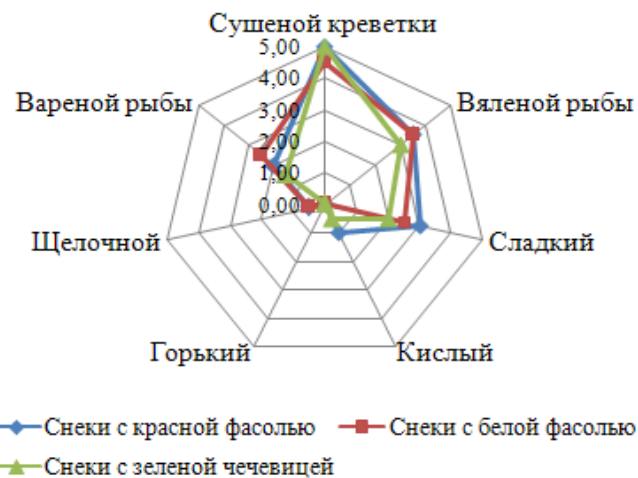
Цвет



Консистенция



Запах



Вкус

Рисунок 3.18 – Профилограммы органолептических оценок комбинированных снеков

По запаху, вкусу исследуемые образцы имели выраженные оттенки сушеной креветки и вяленой рыбы с приятным сладким растительным привкусом, без негативных показателей. Оценка критериев консистенции была равнозначна для всех исследуемых образцов. По критериям цвета снеки с чечевицей и белой фасолью также получили схожие оценки. Для красной фасоли распределение оценок по критериям цвета имели существенные отличия от двух других образцов, что связано с присутствием бордового цвета (рисунок 3.18).

3.4.2 Технология комбинированных снеков

На основании полученных экспериментальных данных о рациональном соотношении компонентов рецептуры и продолжительности вакуумной сушки (пункт 3.4.1), а также с учетом действующей технической документации была разработана технология комбинированных снеков из сухого белкового гидролизата и растительного сырья (зеленая чечевица, белая и красная фасоль) (рисунок 3.19). Основные аспекты данной технологии подробно изложены в технологической инструкции к ТУ 10.85.12–007–00471544–2018.

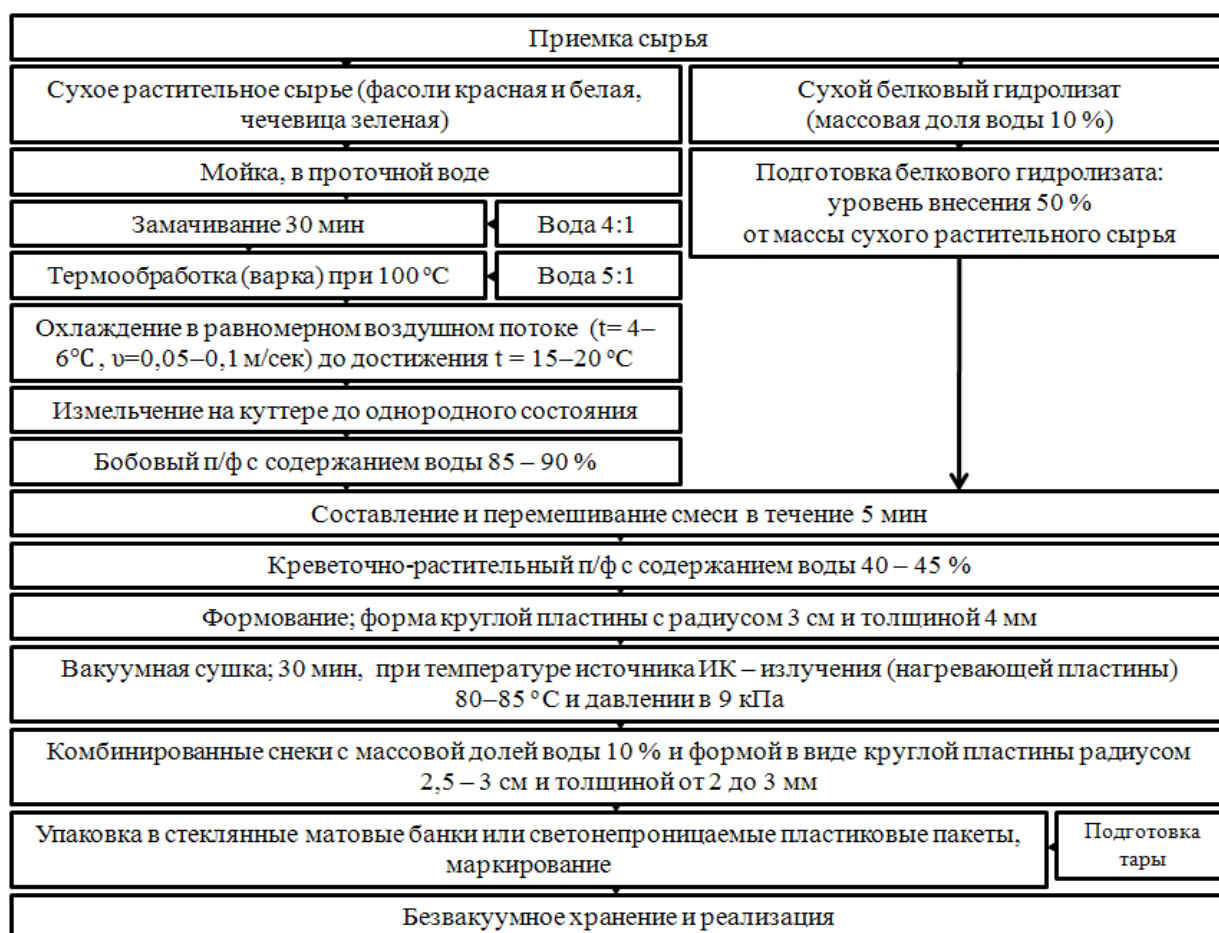


Рисунок 3.19 – Технология комбинированных снеков

Промывание сухого растительного сырья осуществляется в проточной воде. Замачивание происходит в течение 30 мин при соотношении сухого растительного сырья и воды 1:4. Термообработка (варка) осуществляется до достижения кулинарной готовности растительного сырья, после чего проводится его измельчение на промышленном куттере без удаления жидкости (бульона) и охлаждение при температуре 4–6 °С до 15–20 °С (так как температура отварного растительного полуфабриката в 65–75 °С нежелательна для внесения обезвоженного белкового гидролизата, содержащего астаксантин). Смешивание белкового гидролизата (выработанного в соответствии с ТУ 10.89.14–295–00472093–2018166 и ТУ10.20.31–296–00472093–2018) и растительного сырья (зеленой чечевицы, красной или белой фасолей) осуществляется из расчета 50 на 50. Полуфабрикату придается форма круглой пластины с радиусом 3 см и толщиной 4 мм. Вакуумная сушка осуществляется 30 мин при температуре источника ИК–излучения (нагреваемой пластины) 80 – 85 °С и давлении 9 кПа в вакуум-сушильной установке. Конечная форма снеков соответствует круглой пластине с радиусом 2,5–3 см и толщиной от 2 до 3 мм.

Готовые комбинированные снеки (рисунок 3.20) упаковываются в стеклянные матовые банки или светонепроницаемые пластиковые пакеты.



Снеки с красной фасолью

Снеки с белой фасолью

Снеки с зеленой чечевицей

Рисунок 3.20 – Внешний вид комбинированных снеков

Для определения пищевой ценности снеков с зеленой чечевицей (СЗЧ), снеков с красной фасолью (СКФ) и снеков с белой фасолью (СБФ) был изучен их химический (таблица 3.15) и аминокислотный составы.

Таблица 3.15 – Химический состав комбинированных снеков

Наименование вещества	Содержание в 100 г продукта, г		
	Снеки с зеленой чечевицей (СЗЧ)	Снеки с белой фасолью (СБФ)	Снеки с красной фасолью (СКФ)
Протеин	45,6 ± 3,5	45,7 ± 2,1	45,4 ± 3,4
Липиды	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,1
Углеводы	38,4 ± 0,5	38,1 ± 0,6	38,1 ± 0,5
Вода	10,0 ± 0,4	10,0 ± 0,3	10,0 ± 0,3
Минеральные вещества	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1
Астаксантин	0,0045 ± 0,0002	0,0042 ± 0,0001	0,0041 ± 0,0002

Потребление 100 г снеков соответствует суточной потребности человека (4,0–4,5 мг) в астаксантине (таблица 3.15). При рекомендуемом суточном потреблении снеков в количестве 40 г степень удовлетворения физиологической нормы по астаксантину составляет 35–40 %. Данный продукт можно рекомендовать употреблять людям возрастной группы от 18 до 44 лет, как средство профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, а также для укрепления иммунной системы организма.

Для определения показателя потенциальной биологической ценности белка снеков (по НАК) были определены: аминокислотный скор (АС) каждого из образцов в сопоставлении с идеальным белком ФАО / ВОЗ²⁰¹⁵; коэффициент различия аминокислотного сора (КРАС); коэффициент утилитарности аминокислотного состава (U); а также коэффициент сопоставимой избыточности белка (σ_n) (таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Сравнительная оценка биологической ценности белков гидролизата и снеков

Наименование НАК	Идеальный белок (ФАО / ВОЗ ²⁰¹⁵) на 100 г белка, г	НАК БГ, на 100 г белка, г	АС БГ, %	НАК СЗЧ, на 100 г белка, г	АС СЗЧ %	НАК СБФ, на 100 г белка, г	АС СБФ %	НАК СКФ, на 100 г белка, г	АС СКФ %
Тирозин	3,0	1,65	55	2,5	83	2,2	73	2,3	76
Фенилаланин	3,0	2,41	80	2,8	93	2,3	78	2,2	75
Лейцин + Изолейцин	11,0	4,0	44	9,4	85	7,0	64	7,3	66
Метионин	1,7	1,53	90	1,7	100	1,7	100	1,6	95
Валин	5,0	3,32	66	3,6	72	3,9	78	4,2	84
Треонин	4,0	2,81	70	3,8	95	3,1	78	2,9	73
Триптофан	1,0	0,62	62	1,5	151	1,11	111	1,1	110
Лизин	5,5	4,62	84	4,1	74	4,2	76	4,6	84
Гистидин	1,8	1,7	94	1,6	89	1,5	83	1,6	88
Сумма	36,0	22,7	–	31,5	–	27,1	–	27,8	–
КРАС, %		32,7		12,7		24,9		22,8	
БЦ, %		67,3		87,3		75,1		77,2	
U, доли единицы		0,5		0,8		0,6		0,6	
σ _n , г/100г белка		11,3		4,5		8,2		7,5	

Потенциальная биологическая ценность белка снеков с фасолью – красной 77,2 %, белой 75,1 %, и с зеленой чечевицей 87,5 %. Сумма незаменимых аминокислот составляет – 31,5 г / 100 г белка для снеков с чечевицей, 27,1 г / 100 г белка для снеков с белой и 27,8 г / 100 г белка с красной фасолью, что в 1,12–1,30 раза превосходит аналогичный показатель белкового гидролизата. Другие показатели аминокислотной сбалансированности белка снеков также свидетельствуют о ее улучшении: коэффициент утилитарности 0,6 – 0,8, коэффициент сопоставимой избыточности 4,5 – 8,2 г / 100 г белка (таблица 3.16).

Образец снеков, где использовалась зеленая чечевица (СЗЧ), характеризуется наилучшей потенциальной биологической ценностью (87,5 % от идеального белка). Следовательно, применение зеленой чечевицы в качестве компонента, улучшающего аминокислотный состав конечного пищевого продукта, является обоснованным. Анализ аминокислотного состава двух других образцов снеков (СКФ и СБФ), в сопоставлении с идеальным белком, также показал эффективность применения красной и белой фасолей в качестве компонента, улучшающего аминокислотный состав конечного продукта, потенциальная биологическая ценность для белка СКФ находится на уровне 77,2 %, для белка СБФ – 75,1 %.

При определении пищевой ценности одной порции снеков по отношению к суточной потребности человека в возрасте от 18 до 39 лет в протеине и астаксантине использовались данные по химическому составу снеков (формула 3.2):

$$ДН = \frac{ВП}{ДНВ} \times 100\%, \quad (3.2)$$

где ДН – содержание вещества от дневной нормы в продукте, %;

ВП – содержание вещества в продукте, г;

ДНВ – дневная норма вещества, г.

С учетом полученных данных по предложенной методике расчета были определены процентные соотношения содержания веществ на одну порцию в зависимости от необходимой дневной нормы потребления (таблица 3.17).

Таблица 3.17 – Степень удовлетворения дневной потребности в протеине и астаксантине при потреблении снеков

Наименование показателя	Содержание на 1 порцию (40 г), г (усредненное значение)			Средняя суточная норма, г	Процент от суточной нормы		
	СЗЧ	СКФ	СБФ		СЗЧ	СКФ	СБФ
Протеин	18,8	18,8	18,4	100,0	20	20	19
Астаксантин	$1,8 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-4}$	40	38	37

Содержание астаксантина в одной порции снеков удовлетворяет в среднем до 37 – 40 % от дневной потребности человека (таблица 3.17).

Для определения уровня удовлетворения в незаменимых аминокислот при потреблении одной порции снеков (40 г) проведено сопоставление аминокислотного состава белка снеков с суточной потребностью человека в идеальном белке (рисунок 3.21).

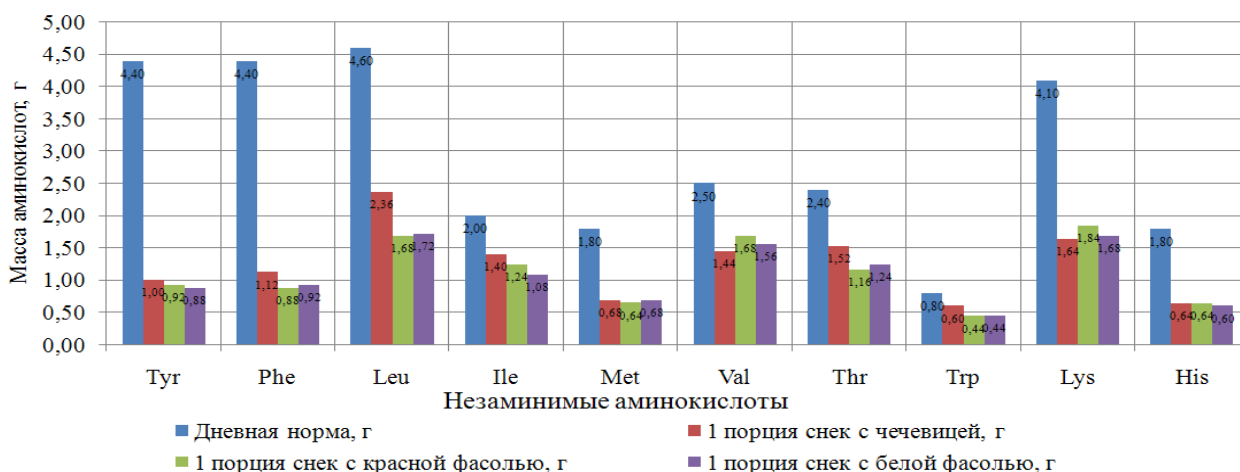


Рисунок 3.21– Необходимое суточное потребление НАК идеального белка в соотношении с НАК, входящими в белок одной порции снеков

Употребление одной порции снеков с зеленой чечевицей (40 г) позволяет удовлетворить суточную потребность организма в незаменимых аминокислотах до 32 %. Употреблению снеков, изготовленных с использованием красной и белой фасолей, удовлетворяет суточную потребность организма в незаменимых аминокислотах до 30 % (в СКФ) и 29 % (в СБФ) соответственно (рисунок 3.21).

Дальнейшее исследование направлено на выявление сроков годности снеков без использования вакуумной упаковки. Исследована динамика изменения микробиологических показателей безопасности (таблицы 3.18 – 3.21), динамика потери астаксантина (рисунок 3.23), а также динамика изменения органолептических оценок при хранении по таким показателям, как вкус, запах, консистенция и цвет (рисунок 3.22). Хранение осуществлялось в специализированной пластиковой, непроницаемой для света таре с крышкой, при температуре в 21 ± 3 °С без вакуума, при влажности не более 70 %.

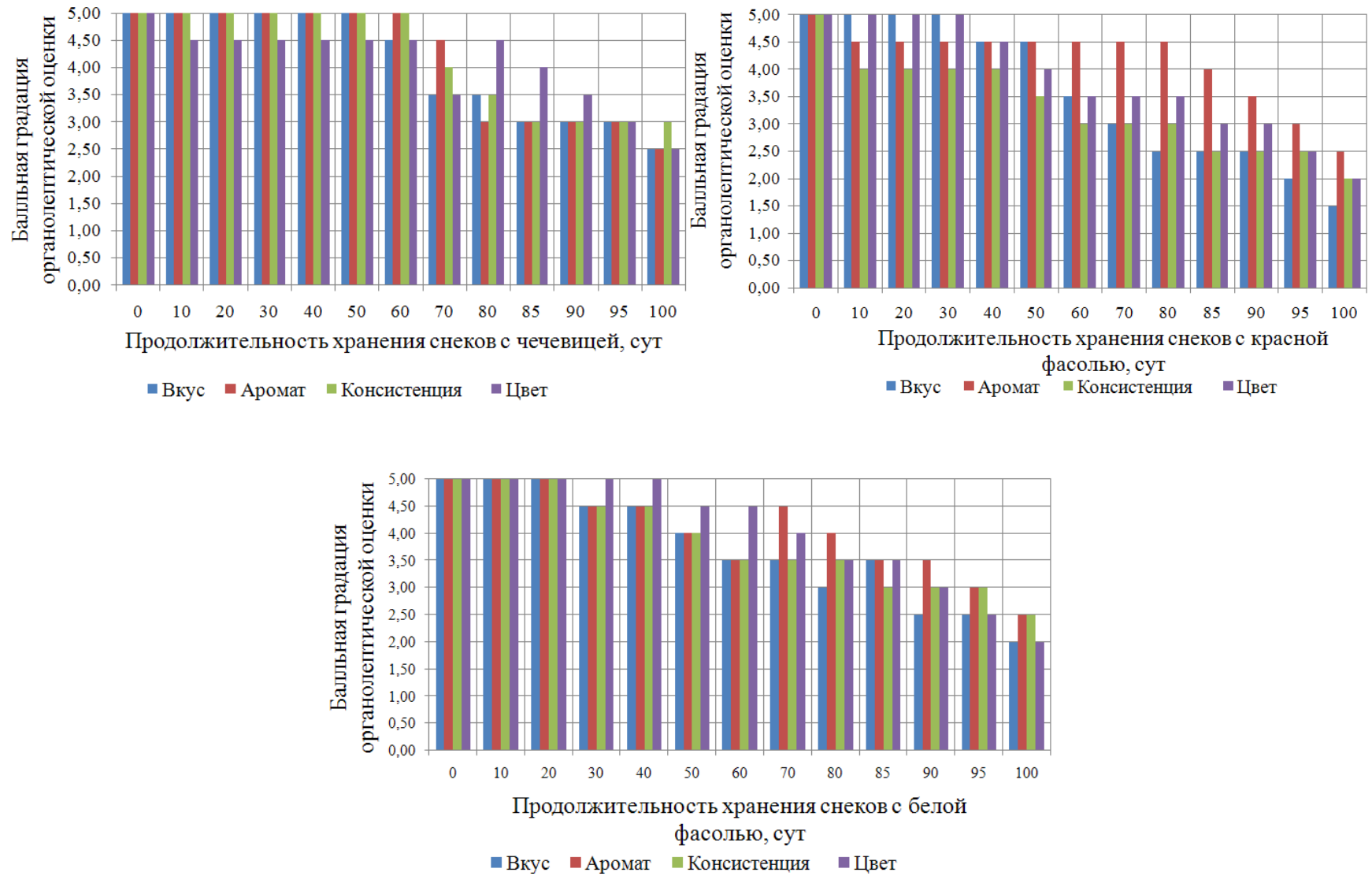


Рисунок 3.22 – Динамика изменения органолептических показателей комбинированных снеков при хранении

Было установлено, что значительного ухудшения органолептических показателей не происходит в течение 60 сут (для СЗЧ) и 50 сут (для СКФ и СБФ) хранения (рисунок 3.22). После 60 сут для СЗЧ и 50 сут для СКФ и СБФ хранения органолептические показатели начинают ухудшаться. Появляются посторонние запахи и привкусы, консистенция становится крошливой. Следовательно, обоснованный срок годности СЗЧ по органолептическим показателям ограничивается 60 сут, для СКФ и СБФ с применением – 50 сут.

При хранении снеков важно учитывать концентрацию астаксантина на протяжении всего срока годности (рисунок 3.23).

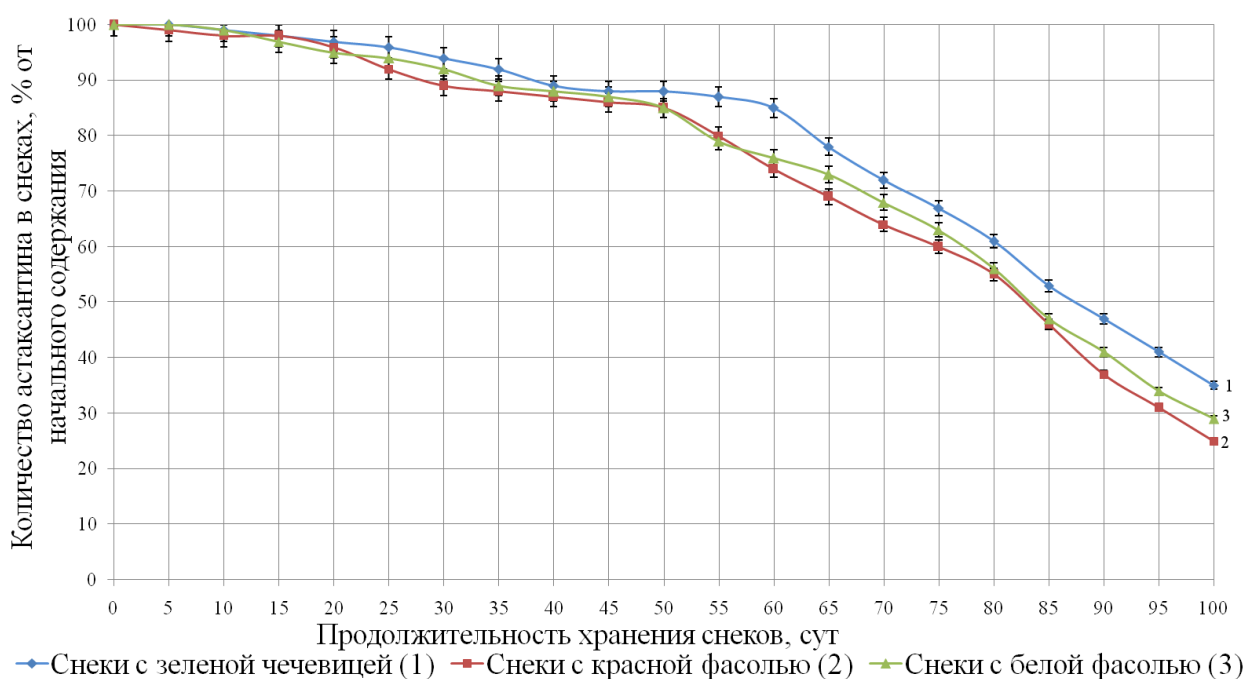


Рисунок 3.23 – Динамика потери астаксантина в процессе хранения снеков

Потери астаксантина увеличиваются в зависимости от продолжительности хранения снеков (рисунок 3.23). Относительно незначительные потери астаксантина во всех образцах наблюдается в течение первых 20–25 сут. Дальнейшее хранение характеризуется более интенсивной потерей астаксантина. Следовательно, срок годности СЗЧ необходимо ограничить 60 сут, так как концентрация астаксантина остается в пределах 86 % от начальной, что соответствует заявленным 35 % суточной потребности в данном каротиноиде. Образцы СКФ и СБФ показали аналогичную динамику, однако заявленная концентрация астаксантина в 35 % от суточной потребности сохраняется только в течение первых 50 сут.

Проведенное исследование показало, что при сравнении результатов хранения БГ без вакуума в течение 60 сут потери астаксантина составляют 30 % от общей концентрации (подраздел 3.3), что на 14–17 % больше для того же периода хранения комбинированных снеков. Возможно, введение растительного сырья (бобовых) сокращает процент потерь астаксантина в конечном изделии за счет присутствия в снеках флавоноидов / изовлавоноидов растительного сырья.

Проведены исследования микробиологической безопасности вырабатываемых комбинированных снеков в течение 90 сут хранения (таблицы 3.18–3.21).

Таблица 3.18 – Динамика изменения КМАФАнМ при хранении комбинированных снеков

Продолжительность хранения, сут	Показатели КМАФАнМ КОЕ/г, (см ³)			
	Рекомендуемые показатели для сушеной рыбной продукции (не более)	Снеки с зеленой чечевицей	Снеки с белой фасолью	Снеки с красной фасолью
0	2×10^4	$1,2 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$
10		$3,2 \times 10^1$	$3,4 \times 10^1$	$3,2 \times 10^1$
20		$6,2 \times 10^1$	$5,9 \times 10^1$	$6,1 \times 10^1$
30		$9,2 \times 10^1$	$7,1 \times 10^1$	$9,2 \times 10^1$
40		$1,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
50		$1,4 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$
60		$1,7 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
70		$1,8 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
80		$1,9 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$
90		$3,6 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$

Таблица 3.19 – Микробиологические показатели снеков с чечевицей

Продолжительность хранения, сут	Соотношение бактерий, %			Санитарные показатели				Плесени, КОЕ/г	Дрожжи, КОЕ/г
	Кокки	Палочки без спор	Палочки со спорами	Облигатные анаэробы	E. coli	Listeriamonocytogenes	S. enteritidis		
0	5	48	47	-	-	-	-	0	-
10	5	48	47					1	
20	5	48	47					6	
30	6	46	48					9	
40	7	45	48					12	
50	7	45	48					16	
60	8	44	48					18	
70	8	44	48					19	
80	8	42	50					21	
90	10	40	50					26	

Таблица 3.20 – Микробиологические показатели снеков с красной фасолью

Продолжительность хранения, сут	Соотношение бактерий, %			Санитарные показатели				Плесени, КОЕ/г	Дрожжи, КОЕ/г
	Кокки	Палочки без спор	Палочки со спорами	Облигатные анаэробы	E. coli	Listeriamonocytogenes	S. enteritidis		
0	5	50	45	-	-	-	-	0	-
10	5	49	46					2	
20	5	48	47					6	
30	6	46	48					9	
40	7	45	48					12	
50	7	45	48					15	
60	8	43	49					18	
70	8	42	50					18	
80	9	41	50					21	
90	12	38	50					27	

Таблица 3.21 – Микробиологические показатели снеков с белой фасолью

Продолжительность хранения, сут	Соотношение бактерий, %			Санитарные показатели				Плесени, КОЕ/г	Дрожжи, КОЕ/г
	Кокки	Палочки без спор	Палочки со спорами	Облигатные анаэробы	E. coli	Listeriamonocytogenes	S. enteritidis		
0	8	45	47	-	-	-	-	0	-
10	8	45	47					2	
20	8	45	47					6	
30	9	44	47					10	
40	9	44	47					12	
50	9	45	45					17	
60	10	45	45					19	
70	10	42	48					20	
80	10	40	50					22	
90	10	40	50					28	

Показатели количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в течение 90 сут не превышали установленных в тех. регламенте (ТРТС021/2011, ТРЕАЭС 40/2016) пределов для сушеной рыбной продукции (не более 2×10^4 КОЕ/г) для всех образцов комбинированных снеков (таблицы 3.19 – 3.21).

При хранении во всех трех образцах увеличивалось количества палочек со спорами, а также кокков и плесени, и параллельно наблюдалось сокращение видового состава некоторых микроорганизмов, что объясняется отсутствием благоприятных условий для их развития.

Таким образом, с учетом коэффициента запаса в 1,2 обоснованным сроком годности снеков, выработанных с применением зеленой чечевицы при температуре в 21 ± 3 °С без доступа света, являются 50 сут с момента изготовления. Для образцов СКФ и СБФ обоснованный срок годности стоит ограничить 40 сут.

3.4.3 Производственная апробация разработанной технологии снеков

Технология комбинированных снеков, разработанная в настоящих исследованиях и регламентированная в ТУ10.85.12007-00471544-2018 «Белково-растительные крипсы» была успешно апробирована в условиях пищевого производства ИП «Шалаев В.С.» (Калининградская область, Гвардейский район, поселок Озерки).

В результате производственных испытаний на ИП «Шалаев В.С.» была выработана опытная партия комбинированных снеков с зеленой чечевицей в количестве 16 кг (400 порций). Специалистами названного предприятия, а также ФГБОУ ВО «КГТУ» дана положительная оценка качества комбинированных снеков, произведенных по технологии кафедры «Технологии продуктов питания» ФГБОУ ВО КГТУ в соответствии с ТУ 10.85.12–007–00471544–2018. Разработанная технология снеков рекомендована к внедрению в производство (Приложение П).

3.4.4 Расчет экономической эффективности технологии комбинированных снеков

Определение экономической эффективности предложенной технологии снеков осуществлялось по общепринятой методике с учетом основных издержек, связанных с приобретением и последующей эксплуатацией технологического оборудования, фонда заработной платы, а также расходами на сырье и транспорт.

При изучении пищевых производств Калининградской области установлено, что выработка снеков может осуществляться на предприятии ИП «Шалаев В.С.», расположенном по адресу: Калининградская область, Гвардейский район, поселок Озерки. Выбранное производство обладает необходимой сырьевой базой, помещениями, а также частично оснащено необходимым оборудованием и инвентарем. Более подробный экономический расчет отображается в Приложении М.

Основные результаты проведенного экономического обоснования проекта представлены в таблице 3.22.

Таблица 3.22 – Основные экономические показатели проектируемого предприятия

№	Показатель	Единица измерения	Годовое значение
1	Комбинированные снеки	т	12
2	Предполагаемое количество выпускаемых упаковок (по 200 г) в год	шт.	60 000
3	Себестоимость 1 упаковки	руб.	74,1
4	Розничная цена упаковки снеков с учетом наценки	руб.	119,0
5	Розничная стоимость 1 кг снеков с учетом наценки	руб.	592,8
6	Общая стоимость вырабатываемых снеков с учетом 60 % наценки	руб.	7 140 000
7	Общие годовые затраты на плановое производство комбинированных снеков	руб.	5 646 520
8	Предполагаемая годовая прибыль с учетом вычета 15 % налога	руб.	1 493 480
9	Капитальные вложения	руб.	4 161 860

Проведенное экономическое исследование показало, что предположительная рентабельность проектируемого предприятия составляет 35 % годовых (таблица 3.22). Стоимость одной упаковки снеков (5 порций по 40 г) без торговой наценки соответствует сумме в 74,1 руб. Расход сырья на порцию снеков соответствует 240 г ПСО, 0,25 г ПГЗх и 20 г растительного компонента (зеленой чечевицы, красной или белой фасолей).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология комбинированных снеков, изготовленных в виде формованного обезвоженного (сухого) астаксантиносодержащего белкового гидролизата и отварных растительных компонентов бобовой группы (зеленой чечевицы, красной и белой фасолей). Предложенная технология способствует эффективному использованию биологически ценных компонентов, выделяемых из ПСО посредством ферментативного гидролиза, а также позволяет получать снеки с приемлемой вкусоароматической композицией, высокими показателями биологической ценности и безопасности. С учетом проведенных исследований разработанные снеки могут рекомендоваться людям молодой возрастной группы для ежедневного потребления.

На основании результатов проведенной научно-исследовательской работы можно сделать следующие выводы:

1. Исследован химический состав гидролизатов, выделенных посредством гидролиза ПСО (в течение 240 мин при температуре 37 ° С и гидромодуле 4:1 и соизмеримой дозировке (по казеину) протосубтилина ГЗх (0,5 %), химотрипсина (0,06 %) и трипсина (0,06 %)). Показано, что для всех выделяемых гидролизатов общие содержания протеина, липидов и астаксантина сопоставимы. Эффективность гидролиза ПСО недорогим ферментом – протосубтилином ГЗх позволяет снизить затраты, связанные с внедрением технологии на производстве.

2. Установлено, что применение частичного гидромеханического удаления мягких тканей (в течение 5 мин при температуре воды 10 ° С и гидромодуле 4:1) в сочетании с последующей ферментативной обработкой позволяет достичь степень депротеинизации ПСО 86 % в течение первых 2,5–3,0 ч. При применении предварительного измельчения ПСО 2 – 5 мм степень выделения протеина увеличивается на 7 %, липидов – на 6–10 %.

3. Обоснованы основные параметры гидролиза – дозировка протосубтилина ГЗх 0,7 % от массы белка ПСО и продолжительность гидролиза 120 мин. Установлено, что при выбранных параметрах гидролиза ПСО доля потерь биологически ценных компонентов минимальна от их общего количества в гидролизате.

4. Разработана технология выделения обезвоженного белкового гидролизата из ПСО креветки, включающая предварительное измельчение, гидромеханическое удаление части белков и липидов, двукратную ферментативную депротеинизацию ПСО, осаждение сухих веществ, в том числе с использованием раствора хитозана, и вакуумное обезвоживание плотной фракции. Разработанная технология ферментативного гидролиза позволяет

извлекать до 86 % протеина, 97 % астаксантина и 94 % липидов от их общего содержания в ПСО.

5. Установлено, что для получения комбинированных снеков с высокими органолептическими характеристиками рациональное соотношение между обезвоженным белковым гидролизатом и растительным сырьем бобовой группы составляет 50 % на 50 % (из расчета на сухое вещество).

6. Предложена технология комбинированных снеков, включающая в себя раздельную подготовку растительного компонента рецептуры, смешивание подготовленного растительного сырья с обезвоженным БГ, формование, вакуумную сушку, а также упаковку и хранение.

7. Изучен химический состав комбинированных снеков. Установлено, что при суточном потреблении снеков в количестве 40 г степень удовлетворения физиологических норм по астаксантину соответствует 35–40 %. Биологическая ценность белка снеков – от 75 % до 87 %. Определены сроки годности комбинированных снеков – с зеленой чечевицей – 50 сут, с красной и белой фасольями – 40 сут.

8. Разработаны технические условия 10.89.14-295-00472093-2018 «Каротинопротеиновый концентрат», ТУ 10.20.31-296-00472093-2018 «Продукт от разделки варено-мороженных креветок», ТУ 10.85.12007-00471544-2018 «Белково-растительные крипсы», а также соответствующие ТИ. Новизна разработанной технологии подтверждена патентом RU № 2690470.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АСВ – азотосодержащие вещества;
- АС – аминокислотный скор;
- БГ – белковый гидролизат (обезвоженный);
- БАД – биологически активные добавки;
- ВБР – водные биологические ресурсы;
- КМАФАНМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов;
- КОЕ – колониеобразующая единица;
- ЛКК – липидокаротиноидный комплекс;
- НАК – незаменимые аминокислоты;
- НБА – небелковый азот;
- ОА – общий азот;
- ПАВ – поверхностно-активные вещества;
- ПГЗх – протосубтилин ГЗх;
- ПСО – панцирьсодержащие отходы;
- СБФ – снеки с белой фасолью;
- СГ – степень гидролиза;
- СЗЧ – снеки с зеленой чечевицей;
- СКФ – снеки с красной фасолью;
- ТХУК – трихлоруксусная кислота;
- ФАО/ВОЗ – Продовольственная и сельскохозяйственная организация (Food and Agriculture Organization, FAO) / Всемирная организация здравоохранения (World Health Organization, WHO);
- ФГ – ферментативный гидролиз;
- ФТА – формольно-титруемый азот.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамзон, А.А. Поверхностно–активные вещества. Свойства и применение / А.А. Абрамзон // Химия. – 1981. – С. 120–250.
2. Абрамзон, А.А. Поверхностно–активные вещества / А.А. Абрамзон // Химия. – 1981. – 304 с.
3. Аламдари, Х. Определение оптимальных режимов получения белковых гидролизированных компонентов из кильки для стартовых кормов осетровых рыб / Х. Аламдари, Н. В. Долганова, С. В. Пономарев // Журнал Вестник АГТУ. – 2013. – № 1. – С. 173–179.
4. Алексеенко, Л. П. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов / Л. П. Алексеенко // Современные методы в биохимии. – Москва: Медицина, Т. 2. – 1968. – 112 с.
5. Антонов, В. К. Специфичность и механизм действия протеолитических ферментов / В.К. Антонов // Биоорг. химия. – 1980. – Т. 6, № 6. – С. 805–839.
6. Антипова, Л.В. Использование вторичного сырья в технологических процессах птицеперерабатывающей промышленности / Л.В. Антипова, С.В. Полянских // Известия вузов. Пищевая технология. – 1998. – № 2. – С. 17–19.
7. Антипов, С.Т. Исследование процесса вакуум–сублимационного обезвоживания пищевых продуктов при различных способах энергоподвода / С.Т. Антипов, А.А. Воронин, А.С. Кумицкий // Вестник МАХ. – 2007. – Т. 2. – С. 44–47
8. Артюхова С. А. Технология продуктов из гидробионтов: учеб. / С.А. Артюхова, В.Д. Богданов, В.М. Дацун. – Москва: Колос, 2001. – 496 с.
9. Артюхин, В. И. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред / В. И. Артюхин, А. П. Шепелин, Н. В. Киселева // Производство и применение продуктов микробиологических производств. – Москва, 1990. – Вып. 9–10. – 52 с.
10. Асатиани, В. С. Ферментативные методы анализа / В. С. Асатиани. – Москва: Наука, 1969. – 740 с.
11. Бабаян, Т. Л. Способ оценки протеиназной активности комплексного ферментного препарата по данным кинетики протеолиза модельного белкового субстрата / Т. Л. Бабаян, В. К. Латов // Биотехнология. – 2003. – № 6. – С. 47–51.
12. Баранов, В. В. Технология рыбы и рыбных продуктов: учебник для вузов / В. В. Баранов, И. Э. Бражная, В. А. Гроховский; под ред. А. М. Ершова. – Санкт–Петербург: ГИОРД, 2006. – 344 с.

13. Баранов, В.В. Технология рыбы и рыбных продуктов / В.В. Баранов, И.Э. Бражная, В.А. Гроховский. – Санкт–Петербург: ГИОРД, 2006. – 944 с.
14. Бахолдина, Л. П. Исследования технологических характеристик и процессов обработки антарктического криля / Л. П. Бахолдина // Сборник трудов АтлантНИРО. – 2008. – №3. – С. 27–35.
15. Баурин, Д.В. Использование мембранных методов для фракционирования и очистки белковых гидролизатов шрота подсолнечника / Д.В. Баурин, А.Б. Романова, И.В. Шакир // Биотехнология и качество жизни: Междунар. науч.–практ. конф.: материалы. – 2014. – С. 243–244.
16. Беликов, В.М. Кинетика казеина протеолитическими ферментами / В. М. Беликов, Т. В. Антонова, Б. А. Квасов // Биоорганическая химия. – 1979. – Т. 5, № 3. – С. 449–457.
17. Беликов, И. Ф. Аминокислотный состав белков семян различных сортов сои и соевой сенной муки / И. Ф. Беликов // Биология возделывания сои. – Владивосток, 1971. – 134 с.
18. Беркович, Л. А. Гидродинамические и конформационные параметры хитозана / Л. А. Беркович, Г. И. Тимофеева, М. П. Цюрупа, В. А. Даванков // Высокомолекулярные соединения. – 1980. – Т.(А) × × II. – № 8. – С. 1828–1833.
19. Богданов, В. Д. Структурообразователи и рыбные композиции / В. Д. Богданов, Т. М. Сафронова. – Москва: ВНИРО, 1993. – 172 с.
20. Болдырев, А. А. Регуляция активности мембранных ферментов / А. А. Болдырев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 6. – С. 21–27.
21. Варламов, В.П. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / В.П. Варламов, К.Г. Скрябин, Г.А. Вихорева, В.П. Варламов. – Москва: Наука, 2002. – 368 с.
22. Вережников, В.Н. Избранные главы коллоидной химии / В.Н. Вережников. – Воронеж: ВГУ, 2011. – 188 с.
23. Волкова, Т.А. Газированные напитки на основе молочной сыворотки / Т.А. Волкова, Э.Ф. Кравченко // Современные технологии пищевых производств нового поколения и их реализация на предприятиях АПК: тез. докл. науч.–практ. конф. – Углич, 2000. – С. 90–92.
24. Виннов, А.С. Кинетический анализ процесса ферментативного гидролиза белков мышечной ткани рыбы / А. С. Виннов, Н. В. Долганова // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2013. – №3. – С. 153–161.

25. Гаврилов, Г.Б. Закономерности мембранного концентрирования сывороточных белков / Б.Г. Гаврилов // Техника и технология пищевых производств. – 2009. – Т. 1. – С. 26–29.
26. Гранатова, В. П. Теория и практика получения и применения натуральных структурообразователей / В. П. Гранатова, А. А. Запорожский, Г. И. Касьянов // Изв. вузов. Пищевая технология. – 2007. – №2. – С. 5–8.
27. Гудзера, О. И. Выделение РНК синтетазы из печени животных экспресс-методом / О. И. Гудзера [и др.] // Биополимеры и клетка. – 1990. – № 2. – С. 105–107.
28. Головач, Т.Н. Антигенные свойства нативных и термообработанных сывороточных белков и их частичных ферментативных гидролизатов / Т.Н. Головач, В.П. Курченко, Л.И. Сурвило // Труды Белорусск. гос. ун-та. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2011. – Т. 6, Ч. 1. – С. 209–223.
29. Горбатова, К.К. Биохимия молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2001. – 320 с.
30. Гинзбург, А.С. Основы теории и техники сушки пищевых продуктов / А.С. Гинзбург – Москва: Пищевая промышленность, 1973. – 528 с.
31. Голубев, В.Н. Пищевые и биологически активные добавки / В. Н. Голубев. – Москва: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.
32. Грицаенко, Н. С. Научное обоснование технологии производства слабосоленой сельди предварительного созревания / Н. С. Грицаенко // Вестник КамчатГТУ. – 2003. – № 2. – С. 24–27.
33. Диксон, М. Ферменты: пер. с англ. / М. Диксон, Э. Уэбб. – Москва: Мир, 1982. – Т. 1. – 515 с.
34. Злобин, А. А. Общая химическая характеристика водорастворимых полисахаридов плодов шиповника морщинистого *Rosa Rugosa* / А. А. Злобин, Р. Г. Оводова, С. В. Попов // Химия растительного сырья. – 2003. – № 2. – С. 39–44.
35. Ивашов, В. И. Получение и применение белковых гидролизатов / В. И. Ивашов, А. Д. Неклюдов, Н. В. Федорова, Р. А. Хромова. – Москва: НИИТЭИММП, 1991. – 44 с.
36. Ильина А. В. Ферментативный гидролиз α -хитина / А. В. Ильина, О. Ю. Зуева, А. С. Лопатин, В. П. Варламов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 42–45.
37. Ильина, А. В. Полиэлектродитные комплексы на основе хитозана / А. В. Ильина, В. П. Варламов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. – № 1. – С. 9–16.

38. Ипатова, Л.Г. Функциональные пищевые продукты. Введение в технологии: учебник / Л.Г. Ипатова, А.Ф. Доронин, А.А. Кочеткова, А.П. Нечаев, С. А. Хуршудян, О.Г. Шубина. – Москва: ДеЛи принт, 2009. – 288 с.
39. Касьянов, Г. И. Нанобиотехнология переработки рыбного сырья / Г. И. Касьянов, О. В. Сарапкина, С. В. Белоусова. – Краснодар: КрасНИИРХ, 2006. – 150 с.
40. Келети, Т. Основы ферментативной кинетики / Т. Келети – Москва: Мир, 1990. – 78 с.
41. Кизеветтер, И.В. Биохимия сырья водного происхождения / И.В. Кизеветтер. – Москва, 1973. – 422 с.
42. Костюрина, К. В. Изучение ферментативной кинетики протеинсодержащего сырья как основополагающего биотехнологического процесса при получении новых продуктов / К. В. Костюрина, М. Е. Цибизова // Вестник АГТУ. – 2007. – № 3 (38). – С. 125–129.
43. Кочеткова, А.А. Функциональные пищевые продукты: некоторые технологические подробности в общем вопросе / А.А. Кочеткова, В.И. Тужилин // Пищевая промышленность. – 2003. – № 5. – С. 25–26.
44. Кочеткова, А. А. Функциональные продукты в концепции здорового питания / А. А. Кочеткова // Пищевая промышленность. – 1999. – № 2. – С. 4–5
45. Колесникова, Н.Г. Разработка технологии и оценка потребительских свойств продуктов питания на основе зерновой фасоли для детей школьного возраста: дис. канд. техн. наук: 05.18.01, 05.18.15 / Н.Г. Колесникова. – Краснодар, 2006. – 237 с.
46. Купина, Н.М. Использование отходов от разделки крабов / Н.М. Купина // Рыбное хозяйство. – 2007. – № 4. – С. 56–57.
47. Кучина, Ю.А. Химический и аминокислотный анализ белковых гидролизатов из гидробионтов, полученных по ферментативной электрохимической технологии / Ю. А. Кучина, С. Ю. Дубровин, И. Н. Коновалова // Инновации в науке и образовании – 2007, 23–25 окт.: V Междунар. науч. конф.: труды науч. конф.: в 2 ч. / КГТУ. – Калининград, 2007. – Ч. 1. – С. 354–357.
48. Краюхина, М.А. Полиэлектролитные комплексы хитозана: формирование, свойства и применение / М.А. Краюхина, Н.А. Самойлова, И.А. Ямсков // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – № 9. – С. 854–869.
49. Ланге, К.Р. Поверхностно–активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение / К.Р. Ланге, Л.П. Зайченко. – Санкт–Петербург: Профессия, 2005. – С. 137–141.

50. Лаженцева, Л. Ю. Разработка технологии нового эмульсионного продукта на основе гидролизата из кальмара / Л. Ю. Лаженцева, О. В. Зимина // Научные труды Дальрыбвтуза. – 2012. – Т. 25. – С. 95–101.
51. Максименко, Ю. А. Исследование кинетики процесса распылительной сушки овариальной жидкости рыб осетровых пород в технологии икорного золя / Ю. А. Максименко // Вестник Астраханского государственного технического ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. – 2011. – № 2. – С. 162–166.
52. Максимова, Е.М. Разработка технологии утилизации белковых отходов методом ферментативного гидролиза / Е.М. Максимова // Вестник МГТУ. – Мурманск, 2006. – Т. 9, № 5. – С. 875–879.
53. Максимюк, Н.Н. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов / Н.Н. Максимюк, Ю.В. Марьяновская // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 1. – С. 34–35.
54. Марч, Дж. Органическая химия: реакции, механизмы и структура / Дж. Марч. – Москва: Мир. – 1987. – Т. 3. – 459 с.
55. Мезенова, О.Я. Использование рыбной чешуи в технологии пищевых и кормовых продуктов / О. Я. Мезенова, Л. С. Байдалинова, В. И. Воробьев, Н. Ю. Мезенова, А. А. Лазукова // Известия КГТУ. – 2015. – №37. – С. 92–101.
56. Мезенова, О.Я. Технология получения хитина и хитозана из сушеного гаммаруса с применением автоферментолиза / О.Я. Мезенова, А.С. Лысова, Е.В. Григорьева, С.М. Вильт // Известия КГТУ. – 2004. – №5. – С. 72–76.
57. Мухин, В. А. Выделение, очистка и характеристика комплекса протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* / В. А. Мухин, В. Ю. Новиков: X научн.–техн. конф. профессорско–преподавательского состава МГТУ: тезисы докладов. – Мурманск: МГТУ, 1999. – С. 354–355.
58. Мухин, В. А. Оценка степени автолиза белка в гепатопанкреасе камчатского краба *Paralithodes camtschatica* методом гель–фильтрации / В.А. Мухин – Мурманск: Изд–во ПИНРО, 2001. – 101 с
59. Мухин, В. А. Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование / В. А. Мухин, В. Ю. Новиков. – Мурманск: Изд–во ПИНРО, 2001. – 101 с.
60. Мухин, В. А. Характеристика протеолитических комплексов, выделенных из гепатопанкреаса крабов / В. А. Мухин, В. Ю. Новиков, Н. М. Куприна, Н. А. Герасимова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 3. – С. 303–307.

61. Миттел, К. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии / К. Миттел. – Москва: Коллоидная химия, 1980. – 154 с.
62. Неклюдов, А.Д. Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами / А. Д. Неклюдов, С. М. Навашин // Прикладная биохимия и микробиология. – 1985. – Т. 21, № 3. – С. 3–17.
63. Неклюдов, А. Д. Получение и очистка белковых гидролизатов / А. Д. Неклюдов, А. Н. Иванкин, А. В. Бердугина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36, № 4. – С. 371–379.
64. Неклюдов, А. Д. Свойства и применение белковых гидролизатов (обзор) / А. Д. Неклюдов, А. Н. Иванкин, А. В. Бердугина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 35, № 5. – С. 525–534
65. Неклюдов, А. Д. Кинетические характеристики ферментативного гидролиза сложных белковых субстратов для получения питательных сред / А. Д. Неклюдов, А. В. Бердугина, А. Н. Иванкин, Б. С. Карпо // Прикладная биохимия. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 381–388.
66. Неклюдов, А. Д. Свойства и применение белковых гидролизатов (обзор) / А. Д. Неклюдов, А. Н. Иванкин, А. В. Бердугина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 30, № 4. – С. 225–334.
67. Немцев, С. В. Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных / С. В. Немцев. – Москва: Издательство «ВНИРО», 2006. – 107 с.
68. Немцев, С.В. Получение низкомолекулярного водорастворимого хитозана / С.В. Немцев // Биотехнология. – 2001. – № 6 – С. 37–42.
69. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман – Москва, 1981. – 286 с.
70. Пащенко, В. Л. Разработка технологии функционального продукта с применением коллагенового гидролизата / В. Л. Пащенко, С. А. Сторублевцев // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 4. – С. 127–135.
71. Просеков, А.Ю. Научные основы производства продуктов питания: лабораторный практикум / А. Ю. Просеков. – Кемерово, 2004. – 54 с.
72. Пилат, Т.Л. Биологически активные добавки к пище (теория, производство, применение): монография / Л.Т. Пилат, А.А. Иванов. – Москва: Аввалон, 2002. – 710 с.
73. Пирогов, А.В. Сравнение метиленовой селективности для обращено–фазовой и микроэмульсионной жидкостной хроматографии / А.В. Пирогов, Е.Б. Пашкова, И.А. Федорова, О.А Шпигун // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. –Т. 11. № 2. – С. 228–235.

74. Погодина, Н.В. Конформационные характеристики молекул хитозана по данным диффузионно–седиментационного анализа и вискозиметрии / Н.В. Погодина, Г.М. Павлов, С.В. Бушин // Высокомолекулярные соединения. – 1986. – Т. 28, № 2. – С. 232–239.
75. Погодина, Н.В. Двойное лучепреломление в потоке в растворах молекул хитозана / Н.В. Погодина, Н. П. Евлампиева, А.З. Хрусталева // Высокомолекулярные соединения. – 1986. – Т. 28, № 2. – С. 241–244.
76. Румянцева, Г.Н. Научные и практические аспекты использования ферментативного катализа в пищевой промышленности: монография / Г.Н. Румянцева // Москва: МГУПБ, 2007. – 101 с.
77. Самонин, В. В. Сорбционные свойства хитозана и возможность его применения для очистки жидких сред / В.В. Самонин, И.Ю. Амелина, Ю.Н. Ведерников, В.А. Доильницын // Журнал физической химии. – 1999. – № 3. – С. 880–883.
78. Самсонов, М.В. Сравнительный анализ выделения астаксантина из панцирных отходов ракообразных с использованием ферментных препаратов трипсин, химотрипсин, протосубтилин / М.В. Самсонов, М.Л. Винокур, М.П. Андреев // Известия КГТУ. – 2017. – №44. – С. 143–150
79. Самсонов, М.В. Исследование процесса гидролиза панцирных отходов вареной креветки с использованием протосубтилина / М.В. Самсонов, М.Л. Винокур, М.П. Андреев // Известия КГТУ. – 2017. – №46. – С. 90–101.
80. Сафронова, Т.М. Сырье и материалы рыбной промышленности / Т.М. Сафронова. – Москва: Агроромиздат, 1991. – 191 с.
81. Сафронова, Т.М. Применение хитозана в производстве пищевых продуктов / Т.М. Сафронова // Хитин и хитозан. Получение, свойства, применение. – Москва: Наука, 2002. – С. 346–359.
82. Сафронова, Т.М. Исследование изменений лечебных свойств хитозана, включенного в пищевые системы совместно с другими функциональными добавками / Т.М. Сафронова, С.Н.Максимова, О.Н. Быканова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007а. – № 4. – С. 18–20.
83. Сажин, Б.С. Научные основы техники сушки / Б.С. Сажин, В.Б. Сажин. – Москва: Наука, 1997, № 4. – С. 5–13.
84. Ситун, Н.В. Использование каррагинана в пищевой промышленности / Н. В. Ситун, В. П. Дедюхина, И. М. Ермак // Вестник ДВГАЭУ. – 2000. – № 3. – С. 84–91.
85. Скурихин, И. М. Как правильно питаться: монография / И. М. Скурихин, В.А. Шатерников. – Москва, 1985. – 318 с.

86. Скоупс, Р. Методы очистки белков: пер. с англ. / Р. Скоупс, В. К. Антонова. – Москва: Мир, 1985. – 358 с.
87. Степанова, Е. В. Сравнение эффективности использования ферментных препаратов полигалактуроназного и β -глюкозидазного действия для стабилизации плодового виноматериала из алычи / Е. В. Степанова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – № 6. – 650 с.
88. Страйер, Л. Биохимия: в 3-х т.: пер. с англ. / Л. Страйер. – Москва: Мир, 1984. – Т. 1. – 232 с.
89. Северин, А.И. Металлопротеиназа / А.И. Северин, О.А. Степная, И.С. Кулаев // А.С. N 1594214, S.U. публ. 1990. – Бюл. № 35. – С. 3–32.
90. Севодина, К.В. Кинетическое моделирование и его роль в изучении процессов неферментативного потемнения пищевых продуктов / К.В. Севодина, Г.И. Севодина // Ползуновский вестник. – 2011. – № 4–1. – С. 56–58.
91. Степанова, Е. В. Сравнение эффективности использования ферментных препаратов полигалактуроназного и β -глюкозидазного действия для стабилизации плодового виноматериала из алычи / Е. В. Степанова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – № 6. – С. 152–360.
92. Строкова, Н.Г. Универсальная комплексная технология переработки культивируемых и промысловых ракообразных / Н.Г. Строкова, Н.В. Семикова, О.В. Ефремов, А.В. Подкорытова // Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки: IV Междунар. науч.–практ. конф.: тез. докл. – Южно–Сахалинск, 2011. – 242 с.
93. Строкова, Н.Г. Биотехнологические аспекты комплексной переработки ракообразных / Н.Г. Строкова, А.В. Подкорытова // Биотехнология: состояние и перспективы: IV Московский междунар. конгресс: материалы. – 2011. – Ч. 2. – С. 241–242.
94. Телишевская, Л.Я. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение / Л. Я. Телишевская – Москва: Аграр. Наука, 2000. – 295 с.
95. Токаев, Э. С. Современный опыт и перспективы использования препаратов сывороточных белков в производстве функциональных напитков./ Э. С. Токаев, Е. Н. Баженова, Р. Ю. Мироедов // Молочная промышленность. – 2007. – № 10. – С. 55–56.
96. Толстогузов, В. Б. Новые формы белковой пищи. Технологические проблемы и перспективы производства / В. Б. Толстогузов. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 303 с.
97. Траубенберг, С.Е. Получение и применение ферментативных соевых гидролизатов / С.Е. Траубенберг, М.М. Пивцаева, Е.В. Милорадова, О.А. Фугол //

Научно–технический прогресс в перерабатывающих отраслях АПК: междунар. конф.: тезисы докладов. Москва. – 1995. – 151 с.

98. Тутельян, В.А. Микронутриенты в питании здорового и больного человека: монография / В.А. Тутельян. – Москва: Колос, 2002. – 424 с.

99. Филлипович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филлипович – Москва: Агар, 1999. – 519 с.

100. Фролов, Ю.Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы / Ю.Г. Фролов. – Москва: Химия, 1982. – 400 с.

101. Хайруллин, М.Ф. Использование стартовых культур при формировании качества мясопродуктов / М. Ф. Хайруллин, М. Б. Ребезов // Проблемы развития АПК Саяно–Алтая: межрегион. научн.–практ. конф.: материалы. – Абакан: КрГАУ, 2009. – С. 74–76.

102. Цибизова, М. Е. Исследование возможности биотрансформации рыбного сырья как основного компонента биопродуктов / М. Е. Цибизова, Н. Д. Аверьянова, Д. С. Язенкова // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. – 2009. – № 1. – С. 170–175.

103. Черногорцев, А. П. Технология получения новых белковых продуктов: учеб.пособие для вузов. / А. П. Черногорцев, Р. Г. Разумовская. – Мурманск, 1999. – 76 с.

104. Шишкина, Л.Н. Влияние центрифугирования на биохимические и физико–химические параметры липидов арахисовой питательной среды / В.А. Меньшов, Л.Н. Шишкина, Е.Б. Бурлакова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1993. – XXIX, вып. 3. – С. 442–448.

105. Шульц, Г. Принципы структурной организации белков / Г. Шульц, Р. Ширмер; пер. с англ. – Москва: Мир, 1982. – 361 с.

106. Щукин, Е.Д. Коллоидная химия / Е.Д. Щукин, А.В. Перцов, Е.А. Амелина. – Москва: Высш. шк., 1992. – 414 с.

107. Шмид, Р. Неформальная кинетика. В поисках путей химических реакций / Р. Шмид, В. Н. Сапунов: пер. с англ. – Москва: Мир, 1985. – 264 с.

108. Щукин, Е.Д. Коллоидная химия / Е.Д. Щукин, А.В. Перцев, Е.А. Амелина. – Москва: Высш. Школа, 2007. – С. 111–120.

109. Язенкова, Д. С. Некоторые аспекты получения белковой массы из маломерного рыбного сырья Волго–Каспийского бассейна / Д. С. Язенкова, Н. Д. Аверьянова, М. Е. Цибизова // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. – 2011. – № 2. – С. 186–192.

110. Якубке, Х.Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х.Д. Якубке, Х. Ешкайт; пер. с нем. Н.П. Запеваловой, Е.Е. Максимова; под ред. Ю.В. Митина. – Москва: Мир, 1985. – 456 с.

111. Adney, B. Measurement of Cellulase Activities / B. Adney, J. Baker // *Chemical Analysis and Testing Task Laboratory Analytical Procedure*. Golden: NREL, 1997. – 11 p.
112. Adler–Nissen, J. Enzymic hydrolysis of food proteins / J. Adler–Nissen [*Process Biochemistry*]1977, – P. 18 – 19.
113. Alder–Nissen, J. Enzymic hydrolysis of food proteins/ J. Adler–Nissen // Elsevier Applied Science Publishers. New York., U.S.A. 1986, – P. 57 – 99.
114. Anema, S.G. Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size / S.G. Anema, Y. Li // *Journal of Dairy Research*. – 2003. – V. 70. – P. 73–83.
115. Bagwe, R.P. Effects of the intermicellar exchange and cations on the size of silver chloride nanoparticles formed in reverse micelles of AOT / R.P. Bagwe, K.C. Khilar // *Langmuir*. 1997. V. 13. № 24. – P. 6432–6438.
116. Bagwe, R.P. Effects of intermicellar exchange rate on the formation of silver nanoparticles in reverse microemulsions of AOT / R.P. Bagwe, K.C. Khilar // *Langmuir*. 2000. V. 16. № 3. – P. 905–910.
117. Bannikova, A. Controlled release of water soluble vitamins in high–solidopolysaccharides with co–solute / A. Bannikova, N. Panyoyai, D.M. Small & S. Kasapis // *In the 16th Food Colloids Conference, April 2016*. – P. 10–13.
118. Bender, M. *Comp. Physiol* / M. Bender, W.Gnatzy, J. Tautz – A. – 1984. – 154, N 1. – P. 45–47.
119. Berezina, O. V. Isolation of a new butanol–producing Clostridium strain: High level of hemicellulosic activity and structure of solventogenesis genes of a new Clostridium saccharobutylicum isolate / O. V. Berezina, A. Brandt, S.V. Yarotsky, W. H. Schwarz, V.V. Zverlov // *Systematic and Applied Microbiology*. 2009. V.32. №7. – P. 449–459.
120. Berry, N. Food–grade microemulsions as nano–scale controlled delivery vehicles / N. Berry, R. Yada, D. Rousseau // *Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing*. (Ed. Dunford N.T.), NY.: J. Wiley & Sons, Inc. 2012. – P. 145–166.
121. Bridi, K. *Surface and colloid chemistry* / K. Bridi – New York. 1997. – 341 p.
122. Coral–Hinostroza, G. N. Astaxanthin from the red crab langostilla (*Pleuroncodes planipes*): optical R/S isomers and fatty acid moieties of astaxanthin esters / G. N.Coral–Hinostroza, B. Bjerkeng // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – V. 133, № 3. – P. 437–444.
123. Claessens, M. The effect of different protein hydrolysate/carbohydratemixtures on postprandial glucagon and insulin responses in healthy subjects / M.Claessens, W. Calame, A.D.

Siemensma, M.A. van Baak, W.H. Saris //European Journal of Clinical Nutrition, 2009. № 63 (1). – P. 48–56.

124. Cunningham, F. Gantt, E. Elucidation of the pathway to astaxanthin in the flowers of *Adonis aestivalis* / F. Cunningham // The Plant Cell. – 2011. – V. 23, № 8. – P. 3055–3069

125. Cheesman, D. F. Carotenoproteins in invertebrates / D. F. Cheesman, W. L. Lee, P. F. Zagalsky // Biological Reviews. – 1967. –V. 42№ 1. – P. 131–160.

126. Danielsson, I. The definition of microemulsion / I.Danielsson, B. Lindman // Colloids Surf. 1981. V. 3. – P. 391–392.

127. Davis, J. B. Total synthesis of astacene / J. B. Davis, B. C. Weedon // Proceedings of the Chemical Society of London. – 1960. № 5. – P. 182–183.

128. Dea, I. C. M. Association of like and unlike polysaccharides mechanism and specificity in galactomannans, interacting with and unlike bacterial polysaccharides, and related systems / I. C. M. Dea, E. R. Morris, D. A. Rees // Carbohydr. Research, 1977. № 57. – P. 249–272.

129. Dendinger, J.E. Mechanical properties in relation to chemical constituents of postmolt cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus* / J.E.Dendinger, A. Alterman // Comp. Biochem. arid Physiol. A. — 1983. – 75, N 3. – P. 421–424.

130. Dreon, M. S. Astaxanthin binding and structural stability of the apple snail carotenoprotein ovorubin /M. S. Dreon, M Ceolín., H. Heras // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2007. – V 460, № 1. – P. 107–112.

131. Diniz, F.M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein / F.M. Diniz // Food Sci and Technol. Int. – 1998. – Vol. 4, № 2. – P. 91–98.

132. Guérard, F. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase / F. Guérard // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2001. – Vol. 11, № 4–6. – P. 1051–1059.

133. Euglert, G. Trans/cis isomerization of astaxanthin diacetate/Isolation by HPLC. and identification by ¹H-NMR. Spectroscopy of three mono-cis-and six di-cis-isomers / G. Euglert, M. Vecchi // Helvetica Chimica Acta. – 1980. – V. 63, № 6. – P. 1711–1718.

134. El-Sherbiny, D. Evaluation of the use of microemulsions as eluents in high-performance liquid chromatography / D. El-Sherbiny, S. El-Ashry, M. Mustafa, A. El-Emam, S. Hansen // J. Sep. Sci. 2003. V. 26. № 6–7. – P. 503–509.

135. Fanun, M. Microemulsions: properties and applications / M. Fanun // CRC Press. 2009. V. 144. – 568 p.

136. Fendler, J.H. Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems / J.H. Fendler, E.J. Fendler // Academic Press. New York. 1975. – 595 p.

137. Ferrer, J. Acid hydrolysis of shrimp–shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate / J. Ferrer, G. Paez, Z. Marmol, E. Ramones, H. Garcia, C.F. Forster // [Bioresource Technology]. 1996. – P. 55 – 60.
138. Fox, D. L. Carotenoids of the roseate spoonbill / D. L. Fox // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1962. – V. 6, № 4. – P. 305–310.
139. Fischer, M. Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein / M. Fischer // Ph.D. Thesis. Wageningen University. 2006. – 58 p.
140. Guetechin, D. Surfactants: classification / D.Guetechin, L. Oldenhove // Surfactant Sci. Ser. 1999. V. 82. – P. 7–46.
141. Gutteridge, J. M. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems / J. M. Gutteridge, B. Halliwell // Trends in Biochemical Sciences. – 1990. – V. 15, № 4. – P. 129–135.
142. Gounaris, K. Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in nature / K. Gounaris, J. Barber // Trends in Biochemical Sciences. – 1983. – V .8, № 10. – p. 378.
143. Giovannetti, R. Kinetic model for astaxanthin aggregation in water–methanol mixtures / R. Giovannetti, L.Alibabaei, F. Pucciarelli // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2009. – V. 73, № 1. – P. 157–162.
144. Haque, Z. U. Effect of casein hydrolysate on association properties of milk protein as seen by dynamic light scattering / Z. U. Haque // J. Agr. and Food Chem. – 1993. – Vol. 41, № 3. – P. 203–207.
145. Hassas, B.V. Ultrafine coal dewatering: relationship between hydrophilic lipophilic balance (HLB) of surfactants and coal rank / B.V. Hassas, F.Karakas, M.S. Celik // Int. J. Miner. Process. 2014. V. 133. № 10. – P. 97–104.
146. Hegdahl, F. The structure and mineralization of the carapace of the crab (*Cancer pagurus* L). 1. The endocuticle / F. Hegdahl, J. Silness, F. Gustavsen // Zool. Sci. – 1977. – N 2. – P. 89—99.
147. Hellweg, T. Phase structures of Microemulsions / T. Hellweg // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2002. V. 7. – P. 50–56.
148. Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., Watanabe, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition / G. Hussein, U. Sankawa, H. Goto, K. Matsumoto, H. Watanabe // Journal of Natural Products. – 2006. – V. 69, № 3. p. 354.
149. Hussein, G. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition / G. Hussein, U. Sankawa, H. Goto, K. Matsumoto, H. Watanabe // Journal of Natural Products. – 2006. – V. 69, № 3. – P. 443–449.

150. Hirano, S. SEM ultrastructure studies of N-acyl- and Nbenzylidene and chitosan membranes / S. Hirano, K. Tobetto, Y. Noishiki // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1981. – Vol. 15. – N 6. – P. 903–911.
151. Hoar, T.P. Transparent water-in-oil dispersions: the oleophobic hydromicelle / T.P. Hoar, J.H. Schulman // *Nature*. 1943. V. 152. № 3847. – P. 102–103.
152. Holanda, H.D. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis / H.D. Holanda, F.M. Netto // [*Food Chemistry and Toxicology*]. 2006. – P. 298 – 303.
153. Hoffman, J.R. Protein – which is best? / J.R. Hoffman & M.J. Falvo // *Journal of Sports Science and Medicine*, 2004. № 3. – P. 118–130.
154. Wasswa, J. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of proteinhydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin / J. Wasswa // *Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 104, № 4. – P. 1698–1704.
155. Aksnes, A. Inclusion of size fractionated fishhydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua* / A. Aksnes, B. Hope, O. Hostmark, S. Albrektsen // *Aquaculture*. – 2006. – Vol. 261, № 3. – P. 1102–1110.
156. Jancic, B. Development of liquid chromatographic method for fosinoprilat determination in human plasma using microemulsion as eluent / B. Jancic, D. Ivanovic, M. Medenica, A. Malenovic // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1088. № 1/2. – P. 187–192.
157. Jin, D.A. Application of hydrophilic-lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana* / Jin, D.A. Streett, C.A. Dunlap, M.E. Lyn // *Biol. Control*. 2008. V. 46. № 2. – P. 226–227.
158. Khaledi, M. Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective / M. Khaledi // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 780. № 1–2. – P. 3–40.
159. Köpsel, C. Structure investigations on assembled astaxanthin molecules / C. Köpsel, H.Möltgen, H. Schuch, H. Auweter, K. Kleinermanns, H. D. Martin, H. Bettermann // *Journal of Molecular Structure*. – 2005. – V. 750, № 1. – P. 109–115.
160. Krichnavaruk, S. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent / S. Krichnavaruk, A. Shotipruk, M. Goto, P. Pavasant // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99, № 13. – P. 5556–5560.
161. Kuhn, R., Lederer, E. Über die farbstoffe des hummers (*Astacus gammarus* L.) und ihre stammsubstanz, das astacin / R. Kuhn, E. Lederer // *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*. – 1933. – V. 66, № 4. – P. 488–495.

162. Kuhn, R. Über astaxanthin und ovoverdin / R. Kuhn, N. A. Sørensen // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*. – 1938(6). – V. 71, № 9. – P. 1879–1888.
163. Kulmyrzaev, A. Influence of pH and CaCl₂ on the stability of dilute whey protein stabilized emulsions / A. Kulmyrzaev, R.Chanamai, D. J. McClements // *Food Research International*, 33, 2000a. – P. 15–20.
164. Kulmyrzaev, A. Rheology and stability of whey protein stabilized emulsions with high CaCl₂ concentrations / A. Kulmyrzaev, M. P. C. Silvestre, & D. J. McClements // *Food Research International*, 33, 2000 b.– P. 21–25.
165. Kumar, G.P., Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery / G.P.Kumar, P. Rajeshwarrao // *Acta Pharm. Sin. B*. 2011. V. 1. № 4. – P. 208–219.
166. Lakshman, M.R. Conversion of all trans β-carotene to retinal by an enzyme from the intestinal mucosa of human neonates / M.R. Lakshman, L.H. Johnson, C. Okoh, M.Attlesey, I. Mydhkorsky // *J. Nutr. Biochem*. 1993. – P. 659 – 663.
167. Lockwood, S. F. Improved aqueous solubility of crystalline astaxanthin (3, 3'-dihydroxy-β, β-carotene-4, 4'-dione) by Captisol(sulfobutyl ether β-cyclodextrin) / S. F. Lockwood, S. O'Malley, G. L. Mosher // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2003. – p. 10.
168. Loffi, M. J. Micronutrient fortification of foods. Current practices, Research and opportunities / M. J. Loffi, M. G. Mannar, R. J Merx // *The Micronutrient Initiative; International Development Research Center; International Agrucultural Center*. Ottawa, Canada, 1996. P. 108.
169. Lu, J. Guillemin G. Effects of chitosan on rat knee cartilages / J. × . Lu, F. Prudhommeaux, A. Meunier, L. Sedel, G. Guillemin // *Biomaterials*. – 1999. – Vol. 20. – N 20. – P. 1937–1944.
170. Manunta, C. Astaxanthin in insects and other terrestrial arthropods / C. Manunta // *Nature*. – 1948. – V. 162. – p. 298.
171. Markey, P.T. In salmonlds from the Eastern United States: associated lesions in rainbow trout / P.T. Markey, V.S. Blazer, M.S. Ewing, K.M. Kocan // *J Aquat Anim Health* 6. 1994. – P. 318–328.
172. Marsh, A., A review of the background, operating parameters and applications of microemulsion liquid chromatography (MELC) / A. Marsh, B.J. Clark, K.D. Altria // *J. Sep. Sci*. 2005. V. 28. № 15. – P. 2023–2032.
173. Matthews, B.W. Threedimensional structure of thermolysin / B.W. Matthews, J.N.Jansonius, P.M. Colman, B.P. Schoenborn // *Nature new biology*. – 1972. – V. 238. – P. 37–41.
174. Matsuno, T. Reductive metabolic pathways of carotenoids in fish (3S, 3' S)–astaxanthin to tunaxanthin A, B and C / T. Matsuno, M. Katsuyama, T. Maoka, T. Hirono, T.

Komori // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1985. – V. 80, № 4. – P. 779–789.

175. Mc. Evoy, E. The Development and application of oil-in-water microemulsion liquid and electrokinetic chromatography for pharmaceutical analysis / E. McEvoy // PhD thesis. Waterford: Waterford Institute of Technology. 2008. – p. 296.

176. Meyers, H.M. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction / H.M. Meyers, S.P. Meyers // *J. Food Sci.*, 1983. – P. 1516 – 1555.

177. Moore, S. Chromatography aminoacids on sulfonated polystyrene resins / S. Moore, D. Spackman, W. Stein // *Analyt. Chem.* – 1958. – Vol. 30. – P. 1185–1190.

178. Mukhin, V. A. Enzymes and Enzymatic Hydrolysates from Invertebrates of the Barents Sea / V. A. Mukhin, V. Yu. Novikov // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2001. Vol. 37, № 5. – P. 538–542.

179. Muzaifa, M. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis / M. Muzaifa, N. Safriani, F. Zakaria // *Aquaculture, Aquarium, Conversation & Legislation. International Journal of the Bioflux Society*. 2012. – Vol. 5, № 1. – P. 36–39.

180. Muzzarelli, R. A. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences / R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli // *Polysaccharides I*. – Springer Berlin Heidelberg. – 2005. –P. 151–209.

181. Michon, C. Structure evolution of carrageenan/milk gels: effect of shearing, carrageenan concentration and nu fraction on rheological behavior / C. Michon, C. Chapuis, Langendorff V., Boulenguer P., Cuvelier G. // *Food Hydrocolloids*. – 2005. – Vol. 19. – N 3. – P. 541–547.

182. Negro, J. J. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarkii*) / J. J. Negro, J. Garrido-Fernandez // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2000. – V. 126, № 3. – P. 347–352.

183. Nekljudov, A. D. Poluchenie i ochistka belkovykh gidrolizatov [Obtaining and purification of protein hydrolysates] / A. D. Nekljudov // *Journal of Applied biochemistry and Microbiology*, 2000, vol. 34.– P. 371–379.

184. Noverian, H. Effect of different levels of astaxanthin on shell color and growth indices of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschcholtz, 1823) / H. Noverian, A. H. Vayghan, A. R. Valipour // *World Journal of Fish and Marine Sciences*. – 2011. – V. 3, № 4. – P. 269–274.

185. Noël, P. Comparative study of tegumentary carotenoids in *Processa edulis*, and *Lysmata seticaudata* (Crustacea, Caridae) / P. Noël, Y. Couturier–Bhaud // *Comp. Biochem. and Physiol. B.* — 1981. — 70, N 3. — P. 571–578.
186. Ontiveros, J.F. A simple method to assess the hydrophilic lipophilic balance of food and cosmetic surfactants using the phase inversion temperature of C10E4/n–octane/water emulsions / J.F. Ontiveros, C. Pierlot, M. Catte, V. Molinier, J.–L. Salager, J.–M. Aubry // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2014. V. 458. — P. 32–39.
187. Osterlie, M. Accumulation of astaxanthin all–E, 9Z and 13Z geometrical isomers and 3 and 3' RS optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective / M. Osterlie, B. Bjerkeng, S. Liaaen–Jensen // *The Journal of Nutrition.* — 1999. — V. 129, № 2. — P. 391–398.
188. Pacheco–Aguilar, R. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease / R. Pacheco–Aguilar, M. A. Mazorra–Manzano, J. C. Ramírez–Suárez // *Food Chemistry.* — 2008. — Vol. 109, № 4. — P. 782–789.
189. Pieruschka, P. Marcelja, S. Monte Carlo simulations of Curvature–Elastic interfaces / P. Pieruschka, S. Marcelja // *Langmuir.* 1994. V. 10. № 2. — P. 345–350.
190. Pocurull E. Handbook of Water Analysis. Third edition. (Ed. Nollet L.M.L., De Gelder L.S.P.) / E. Pocurull, R.M.Marce // Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC. 2014. — P. 825–843.
191. Pocurull, E. Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility, Second Edition / E. Pocurull // Severian Dumitriu. CRC Press; 2004. — P.1224.
192. Rao, M.B. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases / M.B. Rao, A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1998. — V. 62, No 3. — P. 597–635.
193. Ravenel, J. The cyclic electron pathways around photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii* as determined in vivo by photoacoustic measurements of energy storage / J. Ravenel, G.Peltier, M. Havaux // *Planta.* — 1994. — V. 193. — P. 251–259.
194. Rawlings, N.D. Proteolytic enzymes: aspartic and Metallopeptidases / N.D. Rawlings, A.J. Barrett // *Methods in enzymology.* — 1995. — V. 248. — P. 183–228.
195. Rees, D. A. The carrageenans system of polysaccharides. Part 1. The relation between the κ – and λ –components / D. A. Rees // *J. Chem. Soc.* — 1963. — Vol. 1. — P. 1821–1832.
196. Roer, R.D. Mechanisms of resorption and disposition of calcium in the carapace of the crab *Carcinus maenas* / R.D. Roer // *J. Exp. Biol.* — 1980. — 88, N 21. — P. 205–218.

197. Ribeiro, H. S. Encapsulation of carotenoids / H. S. Ribeiro, H. P. Schuchmann, R. Engel, E. Walz, K. Briviba // USA: Springer New York. – 2010. – P. 211–252.
198. Ruckenstein, E. Thermodynamic Approaches to Microemulsions / E. Ruckenstein // J. Colloid Interface Sci. 1998. V. 204. № 1. – P. 143–150.
199. Rüfer, C. E. Bioavailability of astaxanthin stereoisomers from wild (*Oncorhynchus* spp.) and aquacultured (*Salmo salar*) salmon in healthy men: a randomised, double-blind study / C. E. Rüfer, J. Moeseneder, K. Briviba, G. Rechkemmer, A. Bub // British Journal of Nutrition. – 2008. – V. 99, № 05. – P. 1048–1054.
200. Sarker, D. Engineering of nanoemulsions for drug delivery / D. Sarker // Curr. Drug Deliv. 2005. V. 2. – P. 297–310.
201. Sathishkumar, M. Bicontinuous microemulsion as reaction medium for the β -glucosidase-catalyzed synthesis of n-hexyl- β -D-glucopyranoside / M. Sathishkumar, E.S. Jeong, S.E. Yun, S.P. Mun, J.F. Rusling // Enzyme Microb. Technol. 2008. V. 42. № 3. – P. 252–258.
202. Sathishkumar, M. Role of bicontinuous microemulsion in the rapid enzymatic hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester in a micro-reactor / M. Sathishkumar, R. Jayabalan, S.P. Mun, S.E. Yun // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. № 20. – P. 7834–7840.
203. See, S. F. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo Salar*) skin by Alkalase / S. F. See, L. L. Hoo, A. S. Babji // International food research journal. – 2011. – Vol. 18(4). – P. 1359–1365.
204. Shafiq-Un-Nabi, S. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique / S. Shafiq-Un-Nabi, F. Shakeel, S. Talegaonkar, J. Ali, S. Baboota, A. Ahuja, R.K. Khar, M. Ali // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2007. V. 8. № 2. – P. 12–17.
205. Schechter, I. Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain / I. Schechter, A. Berger // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. Vol. 27, № 2. P. 157–162.
206. Shaw, J., Futch W., Schook L. Induction of macrophage antitumor activity by acetylated low density lipoprotein containing lipophilic muramyl tripeptide / J. Shaw, W. Futch, L. Schook // Proc. Nat. Acad. Sci. 1998. V. 85. P. – 6112–6116.
207. Sharma, R.K. Surfactants: basics and versatility in food industries / R.K. Sharma // Pharm. Mag. 2014. V. 2. № 3. – P. 17–29.
208. Shahidi, F. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*) / F. Shahidi, Han, J. Synowiecki // Food Chemistry. – 1995. Vol. 53, № 3, – P. 285–293.
209. Souza, F.D. Imidazolium-based zwitterionic surfactants: characterization of normal and reverse micelles and stabilization of nanoparticles / F.D. Souza, B.S. Souza, D.W. Tondo, E.C. Leopoldino, H.D. Fiedler, F. Nome // Langmuir. 2015. V. 31. № 12. – P. 3587–3595.

210. Simpson, B.K. The use of proteolytic enzymes to extract Carotenoproteins from shrimp wastes / B.K. Simpson // *Journal of Applied Biochemistry*. – 1985– V.44, No 1. – P. 212–222.
211. Sjoblom, J. Microemulsions – phase equilibria characterization, structures, applications and chemical reactions / J. Sjoblom, R. Lindberg, S. Friberg // *Adv. Colloid Interface Sci.* 1996. V. 65. – P. 125–287.
212. Stark, W. The structure of neutral protease from *Bacillus cereus* at 0.2–nm resolution / W. Stark, R.A.Paupit, K.S.Wilson, J.N. Jansonius // *Eur. J. Biochem.* – 1992. – V. 207. – P. 781–791.
213. Stephen, A. M., Phillips G. O., Williams P. A. Food polysaccharides and their applications / A. M.Stephen, G. O. Phillips, P. A. Williams // *CRC Press*. – 2006. – P. 441–462.
214. Stevenson, R.J. Metabolism of chitin precursors by crayfish tissues during chitin synthesis / R.J. Stevenson, B.P. Hettick // *J. Exp. Zool.* — 1980. — 214, N 1. — P. 37—48.
215. Tadros, T. Formation and stability of nanoemulsions / T. Tadros, P.Izquierdo, E.Esquina, C. Solans // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2004. V. 108–109. – P. 303–318
216. Tanaka, Y. Comparative biochemical studies on carotenoids in aquatic / Y. Tanaka// *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*. – 1978. – V. 27, № 2. – P. 355–422.
217. Thaiudom, S. Effect of k–carrageenan on milk protein polysaccharide mixtures / S. Thaiudom, H. D. Goff // *Int. Dairy J.* – 2003. – Vol. 13. – N 9. – P. 763–771.
218. Travis, D.F. Structural features of mineralization from tissue to macromolecular levels of organization in the decapod Crustacea / D.F. Travis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1963. — 109, N 1. — P. 177–245.
219. Truscott, T. G. New trends in photobiology: the photophysics and photochemistry of the carotenoids / T. G. Truscott // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1990. – V. 6, № 4. – P. 359–371.
220. Valchev, I. Use of enzymes in hydrolysis of maize stalks / I. Valchev, S. Nenkova, P. Tsekova, V. Lasheva // *BioResources*. – 2009. – № 4 (1). – P. 285–291.
221. Ushakumari, U. N., Ramanujan, R. Astaxanthin from shrimp shell waste / U. N. Ushakumari, R. Ramanujan // *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*. – 2012. – V. 1. – P. 1–6.
222. Voss–Foucart, M.F. Etude preliminaire de la diagenese pré–coce des carapaces de *Carcinus maenas* dans un sediment marin. Ateration ultrastructurale et chimique / M.F. Voss–Foucart, J.C, Bussers, G Gofflnet // *Ann. Soc. roy. zool. Belg.* — 1984. — 114, N 1. —P. 145—146.

223. Wageningen, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsions stabilizers / E. Wageningen // *Food Hydrocolloids*, 2009. № 17. – P.1473–1482.
224. Weder, H. Process for the production of a nanoemulsion of oil particles in an aqueous phase / H. Weder, M. Mutsch // *US Patent 5152923*. 1992.
225. Weesie, R. J. Magic angle spinning NMR analysis and quantum chemical modeling of the bathochromic shift of astaxanthin in α -crustacyanin, the blue carotenoprotein complex in the carapace of the lobster *Homarus gammarus* / R. J. Weesie, F. J. H. Jansen, J. C. Merlin, J. Lugtenburg, G. Britton, H. J. Groot, // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36, № 24. – P. 7288–7296.
226. Westermeier, R. *Electrophoresis in Practice* / R. Westermeier // NY, USA : J. Wiley & Sons, 1993. p. – 350.
227. Winsor, P. A. Hydrotrophy, solubilisation and related emulsification processes / P. A. Winsor // *Part I Trans. Faraday. Soc.* 1948. V. 44. – P. 376–382.
228. Witt, H. J. Carrageenan Nature's most versatile hydrocolloid / H. J. Witt // In: Colwell R. R., Pariser E. R., Sinskey A. J. (eds), *Biotechnology of Marine Polysaccharides*; Washington: Hemisphere Publishing Corp. – 1985. – P. 345–360.
229. Yano, I. Calcification of crab exoskeleton / I. Yano // *J. Exp. Biol.* — 1980. — 91, N 5. — P. 187–196.
230. Yermak, I. M., Khotimchenko Yu. S. Chemical properties, biological activities and applications of carrageenan from red algae / I. M. Yermak, Yu. S. Khotimchenko // In M Fingerman, & R. Nagabhushanam (Eds.), *New York, USA/London, UK: Plymouth Science Publishers Inc.* – 2003. – P. 207–255.
231. Zagalsky, P. F., Eliopoulos, E. E., Findlay, J. B. C. The architecture of invertebrate carotenoproteins / P. F. Zagalsky, E. E. Eliopoulos, J. B. C. Findlay // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1990. – V. 97, № 1. –P. 1–18.
232. Zagalsky, P. F., Herring, P. J. Studies on the blue astaxanthin–proteins of *Veella veella* (Coelenterata: Chondrophora) / P. F. Zagalsky, P. J. Herring // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. – 1977. – P. 279.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Федеральное агентство по рыболовству
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Атлантический научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и
океанографии»
(ФГБНУ «АтлантНИРО»)

ОКПД 2 10.20.31.110



Группа Н27
(ОКС 67.120.30)
УТВЕРЖДАЮ
Заместитель
директора
ФГБНУ «АтлантНИРО»
М.П. Андреев

«08» мая 2018 г.

ПРОДУКТЫ ОТ РАЗДЕЛКИ ВАРЕННЫХ КРЕВЕТОК МОРОЖЕННЫЕ

Технические условия

ТУ 10.20.31 – 296 – 00472093-2018

Дата введения в действие «08» мая 2018 г.

РАЗРАБОТАНО

аспирант ФГБОУ ВО «КГТУ»
Самсонов М.В.

ФГБНУ «АтлантНИРО»

ведущий научный сотрудник Винокур М.Л.

г. Калининград
2018

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Федеральное агентство по рыболовству
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Атлантический научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и
океанографии»
(ФГБНУ «АтлантНИРО»)

ОКПД 2 10.20.31.110

Группа: Н 27
(ОКС: 67.120.30)



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора
ФГБНУ «АтлантНИРО»
М.П. Андреев

06 мая 2018 г.

ПРОДУКТЫ ОТ РАЗДЕЛКИ ВАРЕННЫХ КРЕВЕТОК МОРОЖЕННЫЕ

Технологическая инструкция

к ТУ 10.20.31 – 296 – 00472093-2018

Дата введения в действие «06» мая 2018 г.

РАЗРАБОТАНО

аспирант ФГБОУ ВО «КГТУ»
Самсонов М.В.

ФГБНУ «АтлантНИРО»

ведущий научный сотрудник Винокур М.Л.

г. Калининград
2018

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Федеральное агентство по рыболовству
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Атлантический научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и
океанографии»
(ФГБНУ «АтлантНИРО»)

ОКПД 2 10.89.14.120

Группа: Н27
(ОКС: 67.120.30)



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора
ФГБНУ «АтлантНИРО»
М.И. Андреев

28 марта 2018 г.

КОНЦЕНТРАТ КАРОТИНОПРОТЕИНОВЫЙ

Технические условия

ТУ 10.89.14.– 295 – 00472093-2018

Дата введения в действие 28 марта 2018 г.

РАЗРАБОТАНО

аспирант ФГБОУ ВО «КГТУ»
Самсонов М.В.

ФГБНУ «АтлантНИРО»

ведущий научный сотрудник Винокур М.Л.

г. Калининград
2018

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Федеральное агентство по рыболовству
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Атлантический научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и
океанографии»
(ФГБНУ «АтлантНИРО»)

ОКПД 2 10.89.14.120

Группа: Н 27
(ОКС: 67.120.30)



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора
ФГБНУ «АтлантНИРО»
М. П. Андреев

М. П. Андреев
2018 г.

КОНЦЕНТРАТ КАРОТИНОПРОТЕИНОВЫЙ

Технологическая инструкция

к ТУ 10.89.14.- 295 – 00472093-2018

Дата введения в действие «07» *мая* 2018 г.

РАЗРАБОТАНО

аспирант ФГБОУ ВО «КГТУ»
Самсонов М.В.

Самсонов М.В.
ФГБНУ «АтлантНИРО»

ведущий научный сотрудник Винокур М.Л.

Винокур М.Л.

Калининград
2018

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО КГТУ)

ОКПД 2: 10.85.12

Группа: Н 27
(ОКС 67.060)



УТВЕРЖДАЮ;

Ректор ФГБОУ ВО «КГТУ»
В.А. Волкогон

_____ 201 г.

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «КГТУ»
Н.А. Кострикова

_____ « » _____ 201 г.

КРИПСЫ БЕЛКОВО-РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Технические условия

ТУ 10.85.12-007-00471544-2018

Вводится впервые

Дата введения в действие « » _____ 201 г.

РАЗРАБОТАНО:

аспирант кафедры Технология продуктов
питания ФГБОУ ВО «КГТУ»
Самсонов М.В.

ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «АтлантНИРО»
к.т.н., доцент Винокур М.Л.

г. Калининград
2018

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО КГТУ)

ОКПД 2: 10.85.12

Группа: Н27
(ОКС 67.060)

УТВЕРЖДАЮ;

Ректор ФГБОУ ВО «КГТУ»
В.А. Волкогон



« » _____ 201 г.

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «КГТУ»
Н.А. Кострикова

« » _____ 201 г

КРИПСЫ БЕЛКОВО-РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Технологическая инструкция

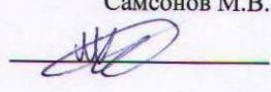
ТУ 10.85.12-007-00471544-2018

Вводится впервые

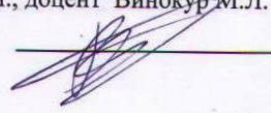
Дата введения в действие « » _____ 201 г.

РАЗРАБОТАНО:

аспирант кафедры Технология продуктов
питания ФГБОУ ВО «КГТУ»
Самсонов М.В.



ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «АтлантНИРО»
к.т.н., доцент Винокур М.Л.



г. Калининград
2018

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2690470

**СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА РЫБОРАСТИТЕЛЬНЫХ
КРИПСОВ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Калининградский государственный технический университет" (RU)*

Авторы: *Самсонов Максим Вячеславович (RU),
Винокур Михаил Леонидович (RU)*

Заявка № 2018136802

Приоритет изобретения 18 октября 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 03 июня 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 18 октября 2038 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 690 470** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
A23L 17/00 (2016.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A23L 17/00 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018136802, 18.10.2018
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.10.2018
Дата регистрации:
03.06.2019
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 18.10.2018
(45) Опубликовано: 03.06.2019 Бюл. № 16
Адрес для переписки:
236022, г. Калининград, Советский пр., 1, каб.
485, ФГБОУ ВО "КГТУ", отдел
интеллектуальной собственности

(72) Автор(ы):
Самсонов Максим Вячеславович (RU),
Винокур Михаил Леонидович (RU)
(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Калининградский
государственный технический университет"
(RU)
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2050796 C1, 27.12.1995. RU
2462047 C2, 27.09.2012. RU 2343716 C2,
20.01.2009. RU 2644957 C1, 15.02.2018. RU
2552653 C1, 10.06.2015. RU 2571791 C1,
20.12.2015.

(54) СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА РЫБОРАСТИТЕЛЬНЫХ КРИПСОВ

(57) Реферат:
Изобретение относится к пищевой промышленности. Предложен способ производства рыбораствительных крипсов, включающий варку и измельчение растительного компонента, охлаждение, смешивание рыбных и отварных растительных компонентов, введение вкусовых добавок, перемешивание, формование смеси. В качестве рыбного компонента используют каротинопротеиновый концентрат с содержанием астаксантина не менее 0,07% на сухое вещество, а в качестве растительного сырья

используют чечевицу. При варке чечевицу и воду берут в соотношении 1:2, а измельчение чечевицы после варки осуществляют без удаления жидкости, кроме того, каротинопротеиновый концентрат к массе сухих веществ чечевицы берут в соотношении 1:1,5, а последующую сушку осуществляют в вакууме при температуре 40-50°C и давлении 8-10 кПа в течение 60-70 мин. Способ обеспечивает получение продукта с повышенным содержанием белка. 1 ил., 5 табл., 6 пр.

RU 2 690 470 C1

RU 2 690 470 C1

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Бланк органолептической оценки снеков

Ф.И.О. дегустатора: _____

Дата проведения дегустации: _____

Наименования дескрипторов	Оценки по 5-балльной шкале					
	0	1	2	3	4	5
Цвет						
Оранжевый						
Коричневый						
Серый						
Красный						
Черный						
Бордовый						
Консистенция						
Твердая						
Сыпучая						
Вязкая						
Хрупкая						
Упругая						
Нежная						
Сочная						
Аромат (Запах)						
Вяленой (сушеной) креветки						
Вяленой (сушеной) рыбы						
Сладкий						
Кислый						
Горький						
Щелочной						
Вареной рыбы						
Вкус						
Вяленой креветки						
Вяленой рыбы						
Сладкий						
Кислый						
Горький						
Щелочной						
Вареной рыбы						

Органолептическая оценка проводится в соответствии с разработанными дескрипторами, по каждому из значений показателя.

Примечание: _____

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ К

Критерии оценки основных органолептических показателей

Наименование показателя	Характеристика показателя	Балл
Вкус	Отлично выраженный	5
	Хорошо выраженный	4
	Выраженный	3
	Недостаточно выраженный	2
	Слабо выраженный	1
	Не ощущается	0
Аромат	Отлично выраженный	5
	Хорошо выраженный	4
	Выраженный	3
	Недостаточно выраженный	2
	Слабо выраженный	1
	Не ощущается	0
Цвет	Отлично выраженный	5
	Хорошо выраженный	4
	Выраженный	3
	Недостаточно выраженный	2
	Слабо выраженный	1
	Не ощущается	0
Консистенция	Отлично выраженная	5
	Хорошо выраженная	4
	Выраженная	3
	Недостаточно выраженная	2
	Слабо выраженная	1
	Не ощущается	0

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Критерии оценки органолептических показателей комбинированных снеков

Коэффициент значимости	Наименование показателя	Характеристика показателя положительные / отрицательные (при наличии)	Балл
0,35	Вкус	Сформированная белково-растительная вкусовая композиция	5
		Вкус отварного растительного сырья и белкового гидролизата/ преобладание белкового вкуса	4
		Вкус отварного растительного сырья, с оттенком белкового гидролизата / появление рыбного оттенка	3
		Вкус отварного растительного сырья, со слабым оттенком белкового гидролизата / преобладание рыбного привкуса	2
		Вкус отварного растительного сырья, со слабо выраженным привкусом белкового гидролизата / Вкус растительного сырья практически не ощущается	1
		Однокомпонентный вкус отварного растительного сырья / ярко выраженный однокомпонентный креветочный вкус	0
0,20	Аромат	Сформированный приятный белково-растительный букет	5
		Запах отварного растительного сырья и белкового гидролизата / преобладание белкового запаха	4
		Запах отварного растительного сырья, с оттенком белкового гидролизата / появление креветочного оттенка	3
		Запах отварного растительного сырья, со слабым оттенком белкового гидролизата / преобладание креветочного оттенка	2
		Запах отварного растительного сырья, со слабо выраженным привкусом белкового гидролизата/ Запах растительного сырья практически не ощущается	1
		Однокомпонентный запах отварного растительного сырья / ярко выраженный однокомпонентный креветочный запах	0
0,25	Цвет	Появление новых выраженных цветов, формирующих привлекательный внешний вид	5
		Цвет соответствует отварному растительному сырию и гидролизату / преобладание цвета белкового гидролизата	4
		Цвет соответствует отварному растительному сырию с оттенком белкового гидролизата / соответствует белковому концентрату, с оттенком отварного растительного сырья	3
		Цвет соответствует отварному растительному сырию со слабым оттенком белкового гидролизата / соответствует белковому концентрату, со слабым оттенком отварного растительного сырья	2
		Цвет соответствует отварному растительному сырию с небольшим оттенком белкового гидролизата / соответствует белковому концентрату, со слабовыраженным оттенком отварного растительного сырья	1
		Соответствует однокомпонентному сырию	0

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ Л

Продолжение таблицы

Коэффициент значимости	Наименование показателя	Характеристика показателя положительные / отрицательные (при наличии)	Балл
0,20	Консистенция	Консистенция, однородная, отлично держит форму, не рассыпается	5
		Консистенция однородная, держит придаваемую форму, не рассыпается, с небольшими белковыми включениями, держит форму	4
		Консистенция однородная, с большими белковыми включениями, плохо держит форму, хрупкая	3
		Консистенция неоднородная, не держит форму, хрупкая	2
		Консистенция неоднородная, не держит форму, хрупкая, местами наблюдаются неровности и разломы	1
		Консистенция неоднородная, не держит форму, хрупкая, многочисленные разломы (трещины)	0

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Определение экономической эффективности технологии снеков

Планируемая ежемесячная мощность выпуска снеков – 1000 кг, что в годовом эквиваленте соответствует 12 000 кг. Экономическая оценка проекта начинается с характеристики основных издержек, связанных с подбором технологического оборудования (таблица М.1). Необходимо учитывать, что снеки хранятся без использования холодильных мощностей в обычной безвакуумной светонепроницаемой упаковке.

Таблица М.1 – Перечень необходимого оборудования для производства снеков

№	Оборудование	Количество	Рыночная стоимость, руб.
1	Бак–ферментер SPEIDEL FD-ZKG без давления ЦКТ 625 Л	1	323000
2	Сепаратор ОСЦП-1	1	537900
3	Вакуумная сушка для овощей и фруктов	2	651200
4	Куттер напольный V23 Robot Coupe R23 (51331)	2	1764900
5	Индукционный запаиватель LGYF-2000BX	1	173000
6	Упаковщик вакуумный полуавтоматический	1	73560
7	Инвентарь, второстепенное оборудование	10	40500
8	Котел варочный напольный KB-50	1	75200
9	Шкаф тепловой	1	35000
Итого			3 674 260

Значительная часть расходов на оборудование (бак-ферментер «SPEIDEL FD-ZKG», сепаратор «ОСЦП-1», одна вакуумная сушка, упаковщик вакуумный полуавтоматический, шкаф тепловой) связана с предполагаемым собственным производством белкового гидролизата. При не востребоваемости снеков предприятие может быть переориентировано на выпуск белковых гидролизатов и жировых концентратов. Так как планируемое производство будет размещено на действующем пищевом предприятии, цеха переработки и выпуска готовой продукции будут оборудованы в соответствии с требованиями санитарных норм и правил, предъявляемыми к производственным помещениям.

Предполагаемые экономические издержки включают в себя расходы на приобретение, установку, наладку и обслуживание оборудования, коммунальные платежи и прочие расходы (таблица М.2).

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ М

Таблица М.2 – Основные затраты на открытие производства

№	Наименование расходов	Общая стоимость, руб.
1	Закупка оборудования	3 674 260
2	Монтажные, пуско-наладочные работы	235500
3	Расходы, связанные с эксплуатацией оборудования, и ежемесячные коммунальные платежи	156100
4	Проведение лабораторных испытаний	16000
5	Амортизационные издержки	80000
Общее		4 161 860

Как следует из полученных данных (таблица М.2), предполагаемые расходы, связанные с открытием производства, соответствуют сумме в 4 161 860 руб. Однако стоит учитывать, что обозначенная сумма не включает экономические издержки, связанные с фондом заработной платы работников, а также налоговыми выплатами.

Предполагается, что на проектируемом предприятии одновременно будет находиться до трех человек в смене. Общее количество работников с учетом сменного графика работы составляет шесть человек (два инженера-технолога на линию по производству белкового гидролизата, два работника на линию по производству комбинированных снеков и два сотрудника на линию упаковки). С учетом сменного графика работы и основных отчислений в ФФОМС РФ и ФСС РФ был рассчитан основной фонд заработной платы работников (таблица М.3).

Таблица М.3 – Основные расходы на фонд заработной платы

№	Должность на производстве	Ставка	Оклад руб.	Налоги (14 %), руб.	Общие затраты, руб.
1	Инженер-технолог	1	28000	3920	31920
2	Инженер-технолог	1	28000	3920	31920
3	Производственный рабочий	1	21000	2940	23940
4	Производственный рабочий	1	21000	2940	23940
5	Упаковщик	1	18000	2520	20520
6	Упаковщик	1	18000	2520	20520
Итого				18760	152760

Исходя из полученных данных таблицы М.3, общие расходы на фонд заработной платы с учетом дополнительных страховых взносов с понижающим коэффициентом (номер 272-ФЗ с 1.01 2011 г.) составляют 152 760 руб. в месяц.

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ М

Важной статьёй расхода проектируемого производства являются расходы на сырьё (таблица М.4). Однако необходимо учитывать, что основное сырьё для белкового гидролизата – ПСО, на производстве являются пищевыми отходами, следовательно, принимается минимальное значение цены в 1000 руб. за тонну ПСО, из которой получается до 90 кг гидролизата – соответственно для 6 000 кг необходимо 68 т ПСО. Также необходимо учитывать, что помимо БГ выделяется сырьё для производства, а также ЛКК до 40 кг с тонны ПСО, что может принести дополнительную прибыль предприятию.

Таблица М.4 – Основные годовые затраты на сырьё для производства 12 000 кг готовой продукции

№	Наименование сырья	Норма расхода, кг	Рыночная стоимость, руб/кг	Общие расходы, руб.
1	Панцирные отходы	68000	1000	68000
2	Растительный компонент (зеленая чечевица / красная или белая фасоли)	6000	30	180000
3	Протосубтилин ГЗх	71,3	500 ¹	35650
4	Прочие добавки, хитозан	140	1000	140000
5	Реактивы (щавелевая кислота)	36,59	3950	144550
Итого				568200

¹ – максимальная рыночная стоимость фермента (ПЗ Зх)

Полученные данные (таблицы М.4) демонстрируют относительно невысокие годовые затраты на сырьё. Однако необходимо учитывать, что основные затраты связаны с расходами на электроэнергию и систему водоснабжения. Следовательно, необходимо рассчитать общие затраты на производство 12 т снеков (таблица М.5).

Таблица М.5 – Общие годовые затраты на плановое производство снеков

№	Наименование основных затрат за 12 месяцев	Общая сумма затрат, руб.
1	Затраты на сырьё	568200
2	Затраты на коммунальные платежи	1 873 200
3	Фонд заработной платы	1 833 120
4	Амортизационные издержки	960 000
5	Проведение лабораторных испытаний	192 000
6	Прочие расходы, расходы на упаковку	220 000
Итого		5 646 520

С учетом полученных данных рассчитывается себестоимость одной упаковки снеков (пять порций – 200 г), включая 60 % торговой наценки (таблица М.6).

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ М

Таблица М.6 – Расчет себестоимости снеков

Наименование продукта	Стоимость 1 кг, руб.	Стоимость упаковки, руб.	Стоимость порции, с 60 % наценкой, руб.	Стоимость упаковки, с 60 % наценкой, руб.	Стоимость всех вырабатываемых снеков, с 60 % наценкой, руб.
Снеки	370,5	74,1	23,8	119	7 140 000

Из данных таблицы М.6 видно, что разница между годовыми затратами и предполагаемой выручкой составляет 1 493 480 руб, включая вычет 15 % налога на прибыль. С учетом основных затрат на открытие производства можно составить план инвестиционного проекта с установлением сроков окупаемости (таблица М.7).

Таблица М.7 – План предполагаемых инвестиций

Предполагаемая окупаемость предприятия	Сальдо на начало работы предприятия, руб.	Сальдо на конец первого года работы предприятия, руб.	Сальдо на конец второго года работы предприятия, руб.	Сальдо на конец третьего года работы предприятия, руб.
	- 4 161 860	-2 668 380	-1 177 900	+318 580

Полученные данные показывают, что срок окупаемости инвестиций составляет два года. Однако такой результат, может быть, достигнут только при стабильном спросе и наличии постоянной сырьевой базы. После достижения сроков окупаемости необходимо снизить торговую наценку для дальнейшего поддержания спроса.

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Протоколы исследований

ЦЕНТР ИСПЫТАНИЙ И ИССЛЕДОВАНИЙ
ООО «САНИТАРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПИЩЕВАЯ ЛАБОРАТОРИЯ»

ИНН/КПП 3906974939/390601001, ОГРН 1153926035284, 236013, Калининградская область, г. Калининград, ул. Алданская, 22

Лицензия № 39.КС.11.001.Л.000004.09.16 от 05.09.2016 г.

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ (ИССЛЕДОВАНИЙ)

№ 5975п

от 27.05.2019 г.

Основание: Заявка/акт приема № 4105п от 21.05.2019

Цель испытаний: Производственный контроль подтверждение соответствия Иные цели: иные цели

Код пробы (образца)	Наименование (описание) пробы (образца)	НД, ТД и т.д. на пробу (образец)	Дата и время изготовления (выработки)	Количество (объем) Пробы / партии	Масса (объем) Блюда (изделия) на ед.
02.4105.02п	Крипсы рыбораствительные.	ТР ЕАЭС 040/2016; ТР ТС 021/2011	21.05.2019 8:07	50 г/ 10 порций	50 г

Код пробы (образца)	Вид упаковки	Состояние упаковки
02.4105.02п	Полимерная упаковка	<input type="checkbox"/> Нарушена <input checked="" type="checkbox"/> Не нарушена

Организация (Заявитель): Самсонов Максим Вячеславович
Изготовитель (Объект): -, г. Калининград, ул. 9 Апреля, 98
Место отбора проб: -

Способ транспортировки: Автотранспорт

Дата и время поступления: 21.05.2019 10:32

Дата проведения испытаний (исследований): 21.05.2019 - 27.05.2019

Ответственный исполнитель: Барченкова Екатерина Владимировна

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ (ИССЛЕДОВАНИЙ):

Код пробы (образца)	Наименование определяемого показателя и единица измерений	Допустимые значения	Результаты испытаний	Погрешность/неопредел-ть	Обозначение НД на метод испытаний
02.4105.02п	S.aureus, в 1,0 г	не допускаются	не обнаружено	-	ГОСТ 31746 п.4.1.1
02.4105.02п	E.Coli, в 1,0 г	не допускается	не обнаружено	-	ГОСТ 30726
02.4105.02п	ПЭБ (в т.ч. сальмонеллы), в 25 г.	не допускаются	не обнаружено	-	ГОСТ 31659
02.4105.02п	Сульфитредуцирующие клостридии, в 1,0 г	не допускаются	не обнаружено	-	ГОСТ 29185 п. 4.2
02.4105.02п	БГКП, в 1,0 г	не допускается	не обнаружено	-	ГОСТ 31747 п.4.1
02.4105.02п	КМАФАнМ, КОЕ/г (см ³)	не более 2x10 ⁴	2x10 ²	-	ГОСТ 10444.15

Дополнительные сведения ответственного Исполнителя исследований (испытаний):

Ответственный за подготовку протокола:  Е.Е. Кузнецова

Руководитель ЦИИ ООО «СТПЛ»:  Е.С. Золотарев

МП

Протокол распространяется на образцы, подвергнутые испытаниям (исследованиям), частичная или полная перепечатка протокола не допускается без разрешения ЦИИ ООО «СТПЛ».

Протокол № 5975п 27.05.2019

Страница 1 из 1

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ Н

ЦЕНТР ИСПЫТАНИЙ И ИССЛЕДОВАНИЙ ООО «САНИТАРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПИЩЕВАЯ ЛАБОРАТОРИЯ»

ИНН/КПП 3906974939/3906010001, ОГРН 1153926035284, 236013, Калининградская область, г. Калининград, ул. Алданская, 22

Лицензия № 39.КС.11.001.Л.000004.09.16 от 05.09.2016 г.

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ (ИССЛЕДОВАНИЙ)

№ 5974п от 27.05.2019 г.

Основание: Заявка/акт приема № 4105п от 21.05.2019

Цель испытаний: производственный контроль подтверждение соответствия иные цели: иные цели

Код пробы (образца)	Наименование (описание) пробы (образца)	НД, ТД и тд. на пробу (образец)	Дата и время изготовления (выработки)	Количество (объем) Пробы / партии	Масса (объем) Блюда (изделия) на ед.
02.4105.01п	Астаксантиносодержащий белковый гидролизат	ТР ЕАЭС 040/2016; ТР ТС 021/2011	21.05.2019 8:07	30 г/ 10 порций	30 г

Код пробы (образца)	Вид упаковки	Состояние упаковки
02.4105.01п	Полимерная упаковка	<input type="checkbox"/> Нарушена <input checked="" type="checkbox"/> Не нарушена

Организация (Заявитель): Самсонов Максим Вячеславович
Изготовитель (Объект): -, г. Калининград, ул. 9 Апреля, 98
Место отбора проб: -

Способ транспортировки: Автотранспорт

Дата и время поступления: 21.05.2019 10:32

Дата проведения испытаний (исследований): 21.05.2019 - 27.05.2019

Ответственный исполнитель: Барченкова Екатерина Владимировна

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ (ИССЛЕДОВАНИЙ):

Код пробы (образца)	Наименование определяемого показателя и единица измерений	Допустимые значения	Результаты испытаний	Погрешность/неопредел-ть	Обозначение НД на метод испытаний
02.4105.01п	S.aureus, в 1,0 г	не допускаются	не обнаружено	-	ГОСТ 31746 п.4.1.1
02.4105.01п	ПЭБ (в т.ч. сальмонеллы), в 25 г.	не допускаются	не обнаружено	-	ГОСТ 31659
02.4105.01п	Сульфитредуцирующие клостридии, в 1,0 г	не допускаются	не обнаружено	-	ГОСТ 29185 п. 4.2
02.4105.01п	БКП, в 1,0 г	не допускается	не обнаружено	-	ГОСТ 31747 п.4.1
02.4105.01п	КМАФАнМ, КОЕ/г (см ³)	не более 2х10 ⁴	4х10 ³	-	ГОСТ 10444.15
02.4105.01п	E.Coli, в 1,0 г	не допускается	не обнаружено	-	ГОСТ 30726

Дополнительные сведения ответственного Исполнителя исследований (испытаний):

Ответственный за подготовку протокола _____ Е.Е. Кузнецова

Руководитель ЦНИ ООО «СТПЛ» _____ Е.С. Золотарев

МП

Протокол распространяется на образцы, подвергнутые испытаниям (исследованиям), частичная или полная перепечатка протокола не допускается без разрешения ЦНИ ООО «СТПЛ».

Протокол № 5974п 27.05.2019

Страница 1 из 1

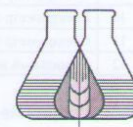
Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ Н

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(Россельхознадзор)

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«КАЛИНИНГРАДСКАЯ МЕЖОБЛАСТНАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ»**

РОССИЯ, 236038, г. Калининград, ул.Танковая, 15, тел/факс: (4012)56-97-31, 56-97-52, 56-97-97 www.kmv.l.ru, e-mail: kmv.l@inbox.ru

ОГРН 1023901012882, ОКПО 00525754, ИНН/КПП 3906079478/390601001



Результат исследований по экспертизе № Э1/9236 от 24.05.2019

При исследовании образца: Астаксантиносодержащий белковый гидролизат (сушеная рыбная продукция) принадлежащего: Самсонов Максим Вячеславович, Российская Федерация, Калининградская обл., г. Калининград, 9 Апреля ул., д. 98, 22

заказчик: Самсонов Максим Вячеславович, Российская Федерация, Калининградская обл., г. Калининград, 9 Апреля ул., д. 98, 22

место отбора проб: Российская Федерация, Калининградская обл., КГТУ, аспирантура

отбор проб произвел: Самсонов М.В., аспирант

производство: Российская Федерация, КГТУ

дата изготовления: 20.04.2018г.

сопроводительный документ: Заявка б/н от 21.05.2019г.

дата поступления: 21.05.2019 09:20

даты проведения испытаний: 21.05.2019 - 24.05.2019

фактическое место проведения испытаний: Калининградская область, г.Калининград, ул.Танковая, 15
на соответствие требованиям: Технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011), утв. решением Комиссии ТС от 09 декабря 2011г. № 880, вступившего в силу с 1 июля 2013г по заявленным показателям, ТР ЕАЭС 040/2016 "О безопасности рыбы и рыбной продукции" принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 18.10.2016г. № 162 по заявленным показателям.
получен следующий результат:

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Погрешность (неопределенность)	Норматив	НД на метод испытаний
В3с. Токсичные элементы						
1	Кадмий	мг/кг	0,053	-	не более 0,2	ГОСТ EN 14083-2013 - Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение свинца, кадмия, хрома и молибдена с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии с атомизацией в графитовой печи с предварительной минерализацией пробы при повышенном давлении
2	Мышьяк	мг/кг	0,80	-	не более 5,0	ГОСТ 31707-2012 (EN 14627:2005) - Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение общего мышьяка и селена методом атомно-абсорбционной спектрометрии с генерацией гидридов с предварительной минерализацией пробы под давлением
3	Ртуть	мг/кг	0,049	-	не более 0,5	ГОСТ Р 53183-2008 - Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение ртути методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара с предварительной минерализацией пробы под давлением
4	Свинец	мг/кг	0,12	-	не более 1,0	ГОСТ EN 14083-2013 - Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение свинца, кадмия, хрома и молибдена с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии с атомизацией в графитовой печи с предварительной минерализацией пробы при повышенном давлении
В3г. Радионуклиды						
5	Стронций 90	Бк/кг	менее 22	-	не нормируется	ГОСТ 32163-2013 - Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90
6	Цезий 137	Бк/кг	менее 4	-	260	ГОСТ 32161-2013 - Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия Cs-137

Применяемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	Дата поверки/аттестации
1	Весы неавтоматического действия CUBIS MSE524P-ICE-DU	02.10.2018
2	Весы электронные РТ 3100	01.06.2018
3	Лабораторная мельница SM-3, ВИЛИТЕК	Не требуется
4	Микроволновой реактор высокого давления Ultra CLAVE	Не требуется
5	Муфельная печь МИМП-17П	07.11.2018
6	Сито лабораторное 1,0 мм	03.10.2018
7	Спектрометр атомно-абсорбционный "PinA Aacle 900T"	14.12.2018

Экспертиза № Э1/9236 от 24.05.2019

Сгенерировано автоматизированной системой «Веста». Идентификатор документа: 7741591A-AC14-40A9-B184-7D3FB4B9DE2B

Стр. 1 из 2

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ Н

8	Спектрометр атомно-абсорбционный "Pin A Aacle 900T"	14.11.2018
9	Спектрометр атомно-абсорбционный "Pin A Aacle 900T"	24.01.2019
10	Спектрометр энергии бета-излучения Бета-1С	28.05.2018
11	Спектрометр энергии гамма излучения Гамма-1С	28.05.2018
12	Сушильный шкаф FD53 BINDER (Германия)	10.07.2018

Лаборатория не несёт ответственности за отбор проб (образцов).

Ответственность за результат исследований по экспертизе несут заведующие отделов ФГБУ "Калининградская МВЛ".

Результат исследований по данной экспертизе распространяется только на пробу, подвергнутую исследованиям.

Директор или лицо уполномоченное по приказу № 298 от 10.09.2018 г.

24.05.2019



И.С. Бувич
И.С. Бувич
Ответственный за оформление экспертизы: Стряпченко В.Э.

№ п/п	Наименование	Единица измерения	Значение	Предел допускабельности	Предел допускабельности	Предел допускабельности	Предел допускабельности	Предел допускабельности
1
2
3
4
5
6

Экспертиза № 21/9236 от 24.05.2019

Сгенерировано автоматизированной системой «Веста». Идентификатор документа: 7741591A-AC14-40A9-B184-7D3FB4B9DE2B

Стр. 2 из 2

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ Н

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР
 Тел: (8 4012) 92-53-06, 92-54-78, факс: (8 4012) 21-99-97, e-mail: icenter@atlantniro.ru
 Аттестат аккредитации № RA.RU.21HK65 (дата внесения в реестр сведений об аккредитованном лице 08.09.2015 г.)

Утверждено
 Руководитель ИЛЦ
 В.В. Шендеров
 «20» апреля 2017 г.
 М.П.



ПРОТОКОЛ № 1215р
 от 20.04.2017 г.

Наименование образца (объекта испытаний): Гидролизат креветочный
 Дата изготовления, срок годности: не указано
 Сопроводительные документы: Заявка заказчика от 17.04.2017 г. (ИЛЦ не несет ответственности за отбор и доставку пробы)
 Характеристика образца (объекта испытаний):
 Место отбора: Лаборатория химико-технологических исследований ФГБНУ «АтлантНИРО»
 Дата отбора: 17.04.2017
 Дата поступления: 17.04.2017
 Время поступления: 17:45:00
 Регистрационный номер (код образца): 1215р.17.1.1
 Изготовитель: Лаборатория химико-технологических исследований ФГБНУ «АтлантНИРО»
 Заявитель: Лаборатория химико-технологических исследований ФГБНУ «АтлантНИРО», г. Калининград, ул. Д. Донского, 5
 Упаковка и её целостность: Не нарушена
 Количество поступившего образца (кг, дм³): 100 г
 Даты проведения испытаний: 17.04.2017-20.04.2017
 Нормативная документация: НД изготовителя
 Цель испытаний (документ, устанавливающий требования к испытаниям): Определение аминокислотного состава
 Исполнители: Талызина О.Д.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ:

Наименование определяемого показателя	Единицы измерения	Допустимые значения	Результаты испытаний	Погрешность/неопределенность*	Обозначение НД на метод испытаний
Аминокислоты					
Аргинин (Arg)	%	-	3,58	1,43	М-04-38-2009
Тирозин (Tyr)	%	-	1,57	0,47	М-04-38-2009
Фенилаланин (Phe)	%	-	2,29	0,69	М-04-38-2009
Гистидин (His)	%	-	1,53	0,77	М-04-38-2009
Лейцин+Изолейцин (Leu+Ile)	%	-	3,80	0,99	М-04-38-2009
Метионин (Met)	%	-	1,45	0,49	М-04-38-2009
Валин (Val)	%	-	3,15	1,26	М-04-38-2009
Пролин (Pro)	%	-	2,24	0,90	М-04-38-2009
Треонин (Thr)	%	-	2,67	1,07	М-04-38-2009
Серин (Ser)	%	-	2,59	0,67	М-04-38-2009
Аланин (Ala)	%	-	2,89	0,75	М-04-38-2009

стр. 1 из 2

Протокол № 1215р

ПРИЛОЖЕНИЕ П

Акт производственных испытаний



УТВЕРЖДАЮ
ДИРЕКТОР ИП «Шалаев В.С.»
ШАЛАЕВ ВЛАДИМИР
СЕРГЕЕВИЧ

20 18 г.

Акт производственных испытаний технологии рыборастворительных снеков

Настоящий акт составлен о том, что «18 сентября 20 18 г. на предприятии (ИП «Шалаев В.С.», Калининградская область, Гвардейский район, поселок Озерки), была изготовлена партия рыборастворительных снеков в количестве 16 кг (400 порций) по технологии, предлагаемой ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» (ФГБОУ ВО КГТУ).


Цель производственных испытаний – установление возможности производства в промышленных условиях рыборастворительных снеков по технологии кафедры «Технологии продуктов питания» ФГБОУ ВО КГТУ согласно ТИ 10.85.12–007–00471544–2018.

Технологический процесс производства рыборастворительных снеков осуществлялся следующим образом. В качестве сырья использовался сухой белковый гидролизат (выработанного в соответствии с ТУ 10.89.14–295–00472093–2018 и ТУ 10.20.31–296–00472093–2018) и растительное сырье бобовой группы (сухая зеленая чечевица). Чечевица промывалась, варилась в воде до достижения кулинарной готовности, после чего измельчалась без удаления жидкости (бульона) и охлаждалась при температуре 4 – 6 °С до 15 – 20 °С. В охлажденную растительную массу добавлялся белковый гидролизат (из расчета 50 % к массе сухих веществ). Полуфабрикат был выполнен в форме круглой пластины с радиусом 3 см и толщиной 4 мм. Сформированный полуфабрикат подвергался сушке в течении 30 минут при температуре источника ИК–излучения (нагреваемой пластины) 80 – 85°С и давлении 9 кПа. Конечная форма рыборастворительных снеков соответствовала круглой пластине с радиусом 2,5 – 3 см при толщине от 2 до 3 мм. Готовые снеки упаковывались светонепроницаемые пластиковые пакеты. Готовая продукция имела цельную и плотную консистенцию, легко разжевывалось, была приятна на вкус и запах, не имела признаков сырости и посторонних оттенков.

Полученные рыборастворительные снеки соответствуют требованиям разработанной технической документации (ТУ 10.85.12–007–00471544–2018) и рекомендуются к изготовлению в производственных условиях.

АКТ подписала комиссия в составе представителей:

от производства ИП «Шалаев В.С.»
директор предприятия

 В.С. Шалаев

от ФГБОУ ВО КГТУ
Аспирант кафедры ТПП

 М.В. Самсонов

Доцент кафедры ТПП, к.н.т.

 М.И. Винокур

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ П



УТВЕРЖДАЮ

ДИРЕКТОР ИП «Шалаев В.С.»

ШАЛАЕВ ВЛАДИМИР

СЕРГЕЕВИЧ

20 18 г.

ПРОТОКОЛ

дегустационного совещания по оценке качества рыборастворительных снеков по технологии ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», проведенного на ИП «Шалаев В.С.»

Калининградская область, Гвардейский район, поселок Озерки
«12 сентября» 20 18 г.

от производства ИП «Шалаев В.С.»

В.С. Шалаев директор предприятия

от ФГБОУ ВО КГТУ

М.В. Самсонов аспирант кафедры ТПП

М.Л. Винокур доцент кафедры ТПП, к.н.т.

ПОВЕСТКА ДНЯ:

1. Рассмотрение образцов рыборастворительных снеков изготовленных на основе сухого белкового гидролизата и зеленой чечевицы.

Слушали:

Сообщение Самсонова М.В. который изложил принципы разработанной в ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» технологии производства рыборастворительных снеков, изготовленных в условиях (ИП «Шалаев В.С.») с учетом имеющегося оборудования.

Производство рыборастворительных снеков осуществлялась согласно Технической инструкции к ТУ 10.85.12-007-00471544-2018.

На дегустацию были представлены комбинированные снеки с целью органолептической оценки качества, товарного вида и перспектив изготовления.

Результаты оценки качества:

Рыборастворительные снеки имеют внешний вид круглых пластин, обезвоженных до консистенции сушеного продукта. Форма изделия правильная, цельная без повреждений. Поверхность чистая, светло-коричневая, без налета, трещин и других видимых дефектов. Консистенция – плотная, упругая, вкус и запах – приятный, характерный для данного типа продукции, без посторонних включений.

Результаты оценивались в баллах по разработанной пятибалльной шкале, с учетом коэффициента значимости отдельных показателей качества (максимальное количество баллов 20) и представлены в таблице.

Таблица – Дегустационная оценка рыборастворительных снеков

Наименование продукта	Консистенция	Запах	Вкус	Внешний вид	Общее количество баллов
Рыборастворительные снеки	5	5	5	5	20

Постановили:

Рыборастворительные снеки, разработанные в ФГБОУ ВО «КГТУ» соответствуют требованиям ТУ 10.85.12-007-00471544-2018. Предлагаемую технологию одобрить и признать рациональной к внедрению.

Директор предприятия

В.С. Шалаев