

#6 автореферат  
Ш78

ОДЕССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

На правах рукописи

ШОЛТЫСЕК Катажина

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТНОГО  
ПРЕПАРАТА ИЗ *Penicillium roqueforti* В ПРОИЗВОДСТВЕ МЯСНЫХ,  
МОЛОЧНЫХ, РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ

Специальность: 05.18.04 - Технология мясных,  
молочных и рыбных продуктов;  
03.00.23 - Биотехнология

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени  
доктора технических наук

Одесса - 1994

СМ

Диссертация является рукописью.

Работа выполнена во Вроцлавской Экономической Академии им. О.Ланге /Польша/ и Одесской Государственной Академии пищевых технологий /Украина/.

Научный консультант

академик Украинской Технологической Академии, доктор технических наук, профессор

Чагаровский А.П.

Официальные оппоненты:

заслуженный деятель науки и техники Украины, академик Академии Технологической кибернетики Украины,

доктор технических наук, профессор

доктор технических наук, профессор

доктор биологических наук, профессор

Чепурненко В.П.

Егоров В.В.

Вовчук С.В.

Ведущая организация – Одесский биотехнологический институт Украинской Аграрной Академии Наук.

1994 г. в

научного совета Д 068.35.03

технологий /270039,

ОНАХТ 08.06.12  
Биотехнологические о



v018077

94 г.

Винникова Л.Г.

## Общая характеристика работы

**Актуальность.** Проблема производства высококачественных продуктов питания, имеющих высокую пищевую ценность, а также повышения эффективности переработки животного и растительного сырья для выпуска товаров народного потребления находится в постоянном центре внимания специалистов агропромышленного комплекса.

Согласно прогнозам большинства известных ученых наиболее перспективным направлением, способствующим решению названных проблем, является инженерная энзимология, включающая в себя раздел биотехнологии, основанный на целенаправленном использовании ферментных препаратов.

Значительная роль в интенсификации существующих методов переработки сельскохозяйственного сырья в пищевые и кормовые продукты отводится протеолитическим ферментным препаратам. Среди них следует выделить препараты микробиологического происхождения, находящие все более широкое распространение ввиду их низкой стоимости, высокой эффективности и простоты промышленного производства в сравнении с препаратами животного и растительного происхождения.

В настоящее время основными источниками получения ферментных протеолитических препаратов являются плесневые грибы родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, дрожжи *Saccharomyces*, бактерии *Bacillus*, а также ряд других микроорганизмов. Вместе с тем, далеко не во всех случаях, из вышеупомянутых бактерий можно получить высокоэффективные протеазы, обладающие нетоксическим действием, которые по своей безвредности могут быть использованы в производстве продуктов питания, кормов и других изделий. С этой точки зрения среди перечисленных микроорганизмов особое место занимают плесневые грибы рода *Penicillium*, получившие широкое применение в производстве лекарственных препаратов и антибиотиков, а также в пищевых технологиях и, в частности, в производстве сыров. Так, упоминание об использовании грибов рода *Penicillium* относится к XI столетию и связано с технологией короля сыров – сыра Рокфор, вырабатываемого при участии голубой плесени *Penicillium roqueforti*, ферменты которой оказывают протеолитическое действие на белки молока в процессе созревания сыра, формируя присущий только этому изделию специфический внешний вид, вкус и консистенцию. Парадоксально, но факт – до настоящего времени род *Penicillium roqueforti* в производстве микробных протеаз практически не использовался. Это, по-видимому, связано

v018077  
ОНАХТ  
БІБЛІОТЕКА

тем, что именно грибы *Penicillium roqueforti* имели сугубо специфическое назначение, а существующие методы получения не позволяли выделить ферментный препарат высокой чистоты и активности. Вместе с тем имеющиеся успехи в области биосинтеза микробных протеаз высокой активности из плесневых грибов дают основание предполагать, что из *Penicillium roqueforti* можно получать протеолитические ферментные препараты, спектр применения которых может быть значительно расширен в технологии производства продуктов питания, кормов и других товаров народного потребления.

В настоящее время во всем мире ведутся интенсивные исследования по получению новых видов ферментных препаратов и вакцин, предусматривающие использование мембранной обработки – ультра- и диафильтрации, как единственных методов, не имеющих альтернативных решений для повышения активности и чистоты вышеуказанных веществ.

С учетом вышеизложенного можно утверждать, что проблема производства ферментного препарата из *Penicillium roqueforti* может быть успешно разрешена. Однако, необходимо указать, что полное решение данной проблемы будет достигнуто только в случае экономической целесообразности промышленного выпуска препарата, т.е. использования его в широких масштабах в перерабатывающих отраслях агропромышленного комплекса и других производствах.

Накопленный опыт свидетельствует о том, что главным потребителем ферментных протеолитических препаратов являются мясная, молочная, рыбная, комбикормовая, пивоваренная и другие отрасли, использующие ферменты для интенсификации технологических процессов, обработки основного и вторичного сырья, повышения пищевой и кормовой ценности конечных изделий. В этой связи комплексное решение проблемы получения ферментного препарата из *Penicillium roqueforti* и интенсификации производства мясных, молочных, рыбных продуктов высокой пищевой ценности, а также кормов на основе его использования и приобретает в настоящее время важнейшее значение.

Работа выполнялась в рамках Центральной Исследовательской программы по развитию пищевой промышленности Польской АН/пн.10-16, п.п.1, 2, 5, 6/, научно-исследовательской программы Министерства народного образования Польши /DNS – 107/063/90-2/, исследовательской программы Вроцлавской Экономической Академии им. О.Ланге, договора о научно-техническом сотрудничестве между Вроцлавской Экономической Академией им.О.Ланге и Одесским технологи-

ческим институтом пищевой промышленности им.М.В.Ломоносова, а также ряда договоров по заказу предприятий.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей диссертации является разработка научных основ получения высокоэффективного протеолитического ферментного препарата из *Penicillium roqueforti* и интенсификация процессов производства мясных, молочных, рыбных продуктов и кормов высокой пищевой и кормовой ценности при его использовании.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

– проанализировать современное состояние по проблеме получения микробных протеаз наиболее эффективного и их использования для переработки сельскохозяйственной продукции;

– разработать и обосновать оптимальные условия биосинтеза ферментного протеолитического препарата из *Penicillium roqueforti* и его очистки на основе ультра- и диафильтрационного разделения культуральной жидкости;

– изучить химический, биохимический, фракционный состав, физико-химические и технологические свойства ферментного препарата из *Penicillium roqueforti*, дать ему токсико-гигиеническую оценку;

– обосновать основные направления использования ферментного протеолитического препарата из *Penicillium roqueforti* в технологии мясных, молочных, рыбных продуктов, кормов и других товаров народного потребления;

– исследовать технологические особенности производства безплесневого сыра Рокпол, твердых, творожных сыров и пептонизированных молочных напитков с использованием препарата из *Penicillium roqueforti*;

– изучить влияние ферментативной обработки полученным препаратом на физические, химические и технологические свойства мышечной ткани крупного рогатого скота, субпродуктов, свиных шкур, рыбной ткани, а также отходов зерноперерабатывающей промышленности;

– разработать нормативно-техническую документацию на новые и усовершенствованные традиционные технологии производства кожи из свиных шкур, кормов, мясных, молочных, рыбных и других изделий на основе использования продуктов биосинтеза плесневых грибов *Penicillium roqueforti*.

Научная новизна. Выяснено, что кислотно-сычужная молочная сыроворотка является прекрасной питательной средой, не требующей дополнительного обогащения энергетическими веществами и микроэлементами для высокоэффективного культивирования грибной плесени *Penicillium roqueforti*.

Установлено, что максимальные значения активности протеаз и прироста грибной биомассы имеют место при стабильных величинах pH /4,5-5,0/ среды в ходе процесса культивирования, температуре 25 °С и количестве подаваемого воздуха 0,5 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup> мин.

Показано, что ультрафильтрационное концентрирование позволяет повысить чистоту препарата и его активность.

Спроделано, что полученный ферментный препарат является сложной гетерогенной системой, содержит 9 фракций с различной электрофоретической подвижностью.

Основными составляющими препарата являются две эндопептидазы - сериновая протеиназа /класс 3.4.21/ и металлопротеиназа /класс 3.4.24/. Установлено, что ферментный протеолитический препарат также обладает липолитической активностью.

Ферментативная обработка препаратом оказывает положительное влияние на такие технологические свойства мяса крупного рогатого скота, как водоудерживающая и эмульгирующая способность, цветность, степень реагирования красителей, повышает переваримость, а также приводит к улучшению реологических характеристик рыбной ткани, побочных продуктов убоя /вымени, трахеи, сычугов, сухожилий/ и колбасных фаршей с их добавками.

Доказано, что внесение препарата в процессе формирования сыра Рокпол, твердых и творожных сыров приводит к интенсификации биохимических процессов при их созревании.

Установлено гидролизующее действие препарата на белки зерновых отходов /отрубей пшеницы, ячменя, овса/ и кератиновой муки, обеспечивающее повышение их кормовой ценности.

Новизна предложенных технических решений, полученных в результате выполненных исследований, подтверждена 8 патентами и 2 заявками на выдачу патентов Республики Польша.

Практическая ценность. Основные результаты работы нашли практическое применение в различных отраслях пищевой промышленности и производства кормов, научно-исследовательских организациях и учебном процессе.

Разработана технология получения высокоэффективного протео-

литического ферментного препарата из плесневых грибов *Penicillium roqueforti*, промышленное освоение которой позволит значительно сократить импорт в Польшу микробных протеаз, используемых в настоящее время в производстве кормовых смесей и моющих веществ. На основе применения ферментного препарата усовершенствованы технологии сыров Рокпол, голландского и творожного; технология дубления свиных шкур; технология кормовых смесей для птиц; технологии сельди балтийской, соленой плотвы пикантной с овощами, ставриды маринованной в уксусе, камбалы копченой и кальмаров, обеспечивающие интенсификацию технологического процесса, повышение качества, пищевой и кормовой ценности готовых изделий.

Разработаны новые технологии безалкогольных и слабоалкогольных пептонизированных молочных напитков, технология ветчины из говядины, технология кормов для свиней и крупного рогатого скота.

Предложено использовать ферментный препарат из *Penicillium roqueforti*; в производстве моющих средств в качестве замены импортного препарата MAXATASE; для улучшения технологических свойств побочных продуктов убоя скота /трахея, вымя, желудок, ахиллесовы сухожилия/, применяемых в технологии фаршевых мясных изделий; для стабилизации и повышения сроков сохранности пива.

Большинство из разработанных технологий внедрено и апробировано в промышленности на перерабатывающих предприятиях г.Вроцлава, г.Конина и других городов Польши.

#### На защиту выносятся:

- научное обоснование и разработка технологического процесса получения высокоэффективного протеолитического ферментного препарата из *Penicillium roqueforti*;

- данные, характеризующие химический, фракционный и биохимический состав, а также физико-химические, технологические свойства и токсико-гигиеническая оценка ферментного препарата из *Penicillium roqueforti*;

- научное обоснование основных направлений использования ферментного протеолитического препарата из *Penicillium roqueforti* в технологии мясных, молочных и рыбных продуктов, кормов и других изделий;

- технические решения совершенствования и интенсификации технологических процессов производства мясных, молочных, рыбных, кормовых продуктов, а также других товаров народного потребления, позволяющие повысить их качество, пищевую и кормовую ценность на осно-

ве использования ферментного препарата из *Penicillium roqueforti*

Апробация работы. Основные материалы диссертации были доложены, обсуждены и одобрены на Международных научных конференциях /Чехословакия, Брно, 1988; Португалия, Лиссабон, 1993; Польша, Познань, 1987/; XI, XII, XIV, XVI, XX, XXI, XXIV научных сессиях Комитета технологии и химии продовольствия Польской Академии Наук /Люблин, 1981; Ольштын, 1982; Познань, 1983; Вроцлав, 1985; Краков, 1989; Варшава, 1990; Варшава, 1991; Вроцлав, 1993/; XX съезде Польского биохимического общества /Ольштын, 1984/; XXI съезде Польского микробиологического общества /Ольштын, 1987/; II Региональном семинаре, посвященном экологии, таксономии и метаболизму бактериальных грибов /Познань, 1991/; III школе молодых ученых сельского хозяйства /Ольштын, 1981/; ежегодных научно-практических конференциях Вроцлавской Экономической Академии /Вроцлав, 1978-1984/; научно-практических конференциях ОТИП им. М.В. Ломоносова /Одесса, 1992, 1993/; межфакультетском заседании ОГАНТ /Одесса, 1994/.

Публикация результатов. Материалы диссертации опубликованы в статьях, 8 патентах и 2-х положительных решениях на выдачу патентов Польши.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, общих выводов, списка использованной литературы и приложений. Содержание диссертации изложено на 300 стр. основного машинописного текста, 47 рисунках и 98 таблицах.

#### Содержание работы

Во введении обоснована актуальность направлений настоящих исследований. Сформулирована цель работы.

В первой главе "Обзор литературы и современное состояние вопроса" рассмотрены методы культивирования микроорганизмов, используемые для биосинтеза ферментных препаратов.

На основе работ Такамина, Ундеркофлера, Ошима, Чайна, Грипона, Бергера, Антиповой, Грачевой, Алеевой, Матцуми, Беднарски, Познански, Якубовски и целого ряда других исследователей проанализировано влияние физико-химических факторов /состав питательной среды, кислотность, температура, продолжительность, условия аэрации и др./ на интенсивность биосинтеза ферментов при культивировании грибов различных родов.

Указано на недостаток информации о возможности получения ферментных препаратов из *Penicillium roqueforti* и режимов процесса культивирования.

Рассмотрены вопросы, связанные с выделением и очисткой ферментных препаратов. Особое внимание уделено таким методам, как: экстракция различными химическими веществами, адсорбционное фракционирование путем ионообменной хроматографии, а также мембранной фильтрации, которая имеет большие перспективы для получения ферментных протеолитических препаратов высокой чистоты.

Приведена современная классификация протеолитических ферментов и дана характеристика грибным протеазам рода *Penicillium*, изложив перспективу или уже используемы при переработке сельскохозяйственной продукции. Освещены области применения грибных протеаз, позволяющих совершенствовать технологические процессы производства мясных, молочных, рыбных, хлебопекарных и кондитерских продуктов, кормов, изделий кожевенной, парфюмерно-косметической, химической и других промышленности.

Анализ и обобщение работ Антиповой, Липатова, Грачевой, Большакова, Шилат, Галаса и целого ряда других исследователей свидетельствуют о том, что использование протеолитических ферментных препаратов в перерабатывающих отраслях агропромышленного комплекса позволяет интенсифицировать производство, повысить качество готовой продукции, ее пищевую и кормовую ценность, сократить расход основных и вспомогательных материалов и снизить энергозатраты.

На основе рассмотрения изложенной информации в данной главе с учетом поставленной цели сформулированы задачи исследований.

Во второй главе "Объекты, методы и техника исследований" приводится характеристика объектов и методов исследований, а также используемого лабораторного оборудования. Объектами исследований служили питательная среда /молочная сыворотка/ для культивирования грибной плесени промышленного штамма *Penicillium roqueforti*, используемого в молочной промышленности Польши; процесс культивирования и ультрафильтрационной обработки продуктов биосинтеза; ферментный протеолитический препарат, а также широкий спектр технологий производства продуктов питания, кормов и других изделий. Общая схема и взаимосвязь этапов исследований приведены на рис. I.

При проведении исследований широко использовались такие современные методы, как электронно-сканирующая микроскопия, газожид-

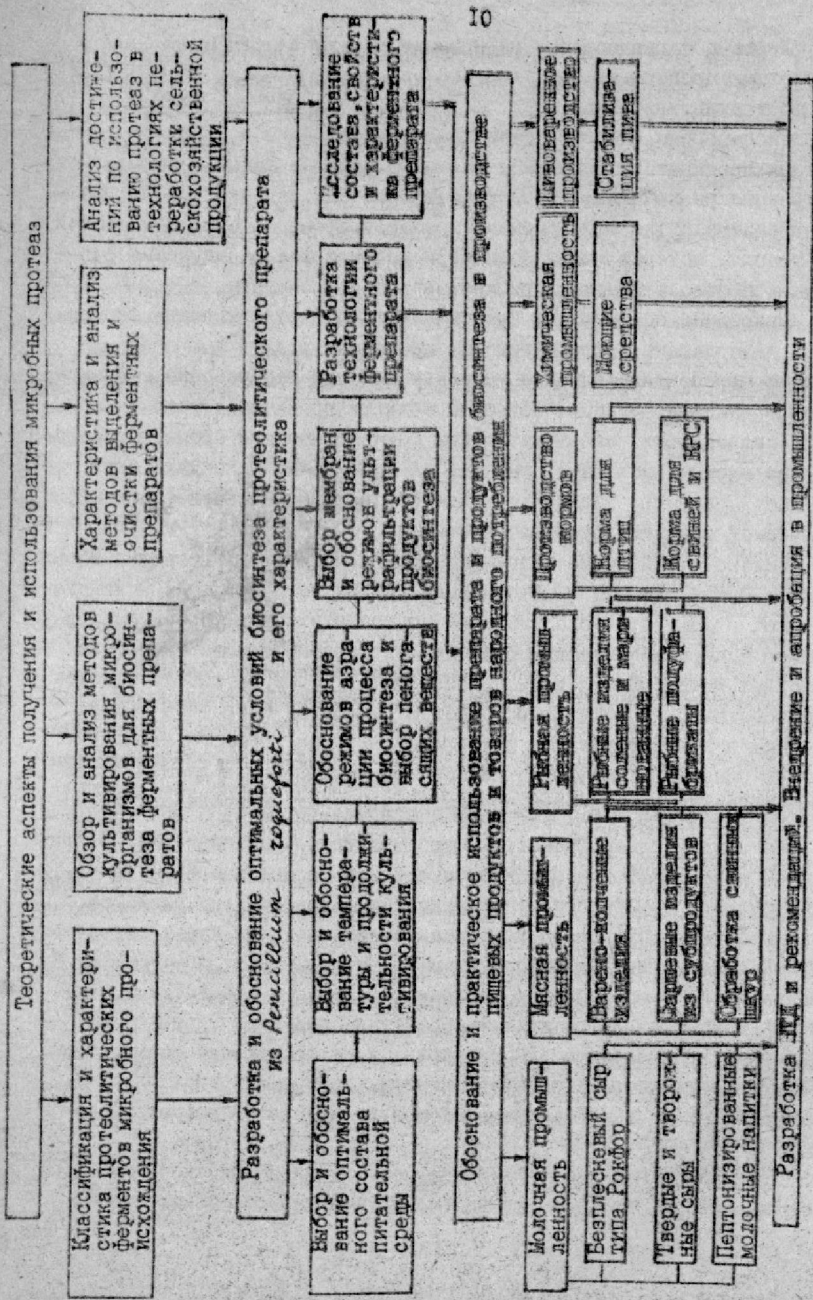


Рис.1. Общая схема и взаимосвязь этапов исследований

костная и жидкостная хроматография, атомно-адсорбционная спектрофотометрия, фотоколориметрия, реометрия и др. Дано краткое описание и перечень применяемых стандартных общеизвестных и оригинальных методов исследований. Приведены сведения об используемых в экспериментальных исследованиях лабораторных приборов и оборудования: автоматизированной ферментативной колонне "Биомер", ультрафильтрационной установке с полыми волокнами фирмы "Амикон" /США/, ультрафильтрационной плоскорамной установке АМШ-0,12 /Украина/, прибора для определения реологических характеристик мышечной ткани и др.

Промышленная апробация разработанных технологий проводилась на перерабатывающих предприятиях г.Вроцлава, г.Коня и других городов Польши.

Третья глава "Разработка, обоснование оптимальных условий биосинтеза ферментного протеолитического препарата из *Penicillium roqueforti* и его характеристика" содержит результаты исследований процесса биосинтеза ферментного препарата из *Penicillium roqueforti*, его выделения, очистки, а также данные, всесторонне характеризующие полученный препарат.

На первом этапе исследований изучалось влияние состава питательной среды, в качестве которой использовалась молочная сыворотка, на протеолитическую активность синтезируемых внеклеточных и внутриклеточных ферментов из *Penicillium roqueforti*. В питательной среде варьировалось содержание азотистых веществ и фосфорных соединений путем внесения в нее  $KNO_3$ ;  $NH_2/2CO$ ;  $NH_4/2HPO_4$  в пересчете на азот в количестве 0,16; 0,32; 0,48 и 0,64 г/дм<sup>3</sup>, а также фосфорные соединения  $NH_2HPO_4$  и  $KH_2PO_4$  в пересчете на фосфор в количестве 53, 60, 71 и 400 мг%. Как показали проведенные исследования увеличение массовой доли азотистых веществ и фосфорных соединений особого значения на повышение протеолитической активности внеклеточных и внутриклеточных протеаз не оказывают. Несколько другая картина имеет место относительно прироста грибной биомассы в целом. Так, при внесении 0,64 г/дм<sup>3</sup>  $NH_4/2HPO_4$  наблюдается наибольший прирост биомассы, который достигает 14,5 г сух.веществ/дм<sup>3</sup>, в то время как прирост биомассы в небогатой сыворотке составляет только 10,1 г/дм<sup>3</sup>. Установлено, что на рост грибной массы оказывают влияние фосфорные соединения, добавление в сыворотку азотистых веществ не приводит к существенному приросту биомассы. Анализ солевого состава молочной сыворотки

а также полученных результатов по подбору оптимального состава питательной среды для биосинтеза протеаз из *Penicillium roqueforti* позволил сделать вывод, что обезбелковая кислотно-сычужная сыворотка не требует дополнительного обогащения энергетическими веществами и микроэлементами, так как обеспечивает желаемое развитие грибной плесени *Penicillium roqueforti* и продуцирование протеаз высокой активности.

При биосинтезе ферментных препаратов важнейшими технологическими параметрами процесса являются рН питательной среды, температура культивирования и аэрация культуральной жидкости. Установлено, что для биосинтеза протеаз из оптимальная температура процесса должна находиться в пределах 25°C, так как обеспечивает максимальную протеолитическую активность в конце культивирования. Исследование влияния рН на эффективность биосинтеза протеаз свидетельствует о том, что этот показатель оказывает существенное влияние на их протеолитическую активность и прирост грибной биомассы /табл.1/. Как следует из этой таблицы наилучшие результаты имеют место при рН = 4,5-5,0.

В табл.2 приведены данные активности протеаз и прироста биомассы, наблюдаемые в случае проведения процесса при стабильных оптимальных значениях рН. Их анализ позволяет заключить, что процесс культивирования *Penicillium roqueforti* необходимо проводить при стабильных значениях рН = 4,5-5,0, обеспечивающих получение протеаз максимальной активности и прирост биомассы.

Проведенные исследования по аэрации воздуха в ферментатор дали возможность установить, что оптимальное количество этого вещества должно составлять 0,5 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup> мин. При этом процесс биосинтеза протеаз продолжается 4-8 суток, идет наиболее эффективно, а активность протеаз и прирост биомассы максимальные.

Для предотвращения пенообразования среды в процессе аэрирования среды изученных веществ пеногасителей /масляная кислота, соевое, подсолнечное, рапсовое масла и масляные отходы/ наилучшим эффектом обладает подсолнечное масло, которое рекомендовано для использования при культивировании *Penicillium roqueforti*.

С целью повышения активности ферментного препарата из *Penicillium roqueforti* изучена возможность очистки и концентрирования культуральной жидкости методом ультрафильтрации. Как показали проведенные исследования широкого ассортимента ультрафильтрационных мембран /УАМ, УПМ производства НИО "Тасма", &R фирмы "Паси-

Таблица 1 х/

рН питательной среды		Максимальная активность протеаз, КЕ/г сух. вещества		Максимальный прирост биомассы, г сух. в-в/дм <sup>3</sup>
в начале процесса биосинтеза	в конце процесса биосинтеза	внеклеточных	внутриклеточных	
4,0	8,0/7,2	1354/1440	2052/2794	10,01/9,501
4,5	7,5/7,6	1562/1870	2390/3605	10,12/9,385
5,0	7,0/7,9	1551/1832	2249/3388	10,10/9,242
5,5	7,2/8,0	748/1142	1298/2091	9,89/9,390
6,0	7,5/-	580/-	1102/-	10,05/-

х/ - в числителе - данные, полученные при проведении процесса в лабораторных колбах; в знаменателе - в ферментативной колонне.

Таблица 2

рН	Максимальная активность протеаз, КЕ/г сух. вещества		Максимальный прирост биомассы, г сух. в-в./дм <sup>3</sup>
	внеклеточных	внутриклеточных	
4,5	2390	4470	9,420
5,0	2277	4299	9,511



Рис.2. Технологическая схема получения ферментных препаратов из *Penicillium roqueforti*

лак", ВПУ-15А производства НПО "Химволокно"/ наиболее подходящими мембранами /селективность по белку ~ 92-95 %, разделяющая способность по молекулярной массе > 20000/ являются мембраны УАМ-50, УАМ-100, ВПУ-15А, 6R-61PP. Сравнительная оценка протеолитической активности неочищенного ферментного препарата и препарата, подвергнутого ультрафильтрации, свидетельствует о том, что она возрастает в пересчете на 1 г сух.веществ с 20 КЕ/см<sup>3</sup> до 60 КЕ/см<sup>3</sup>. Следовательно, применение ультрафильтрации в производстве протеаз из *Penicillium roqueforti* является целесообразным.

Обобщение и анализ полученных результатов позволили разработать технологическую схему производства ферментных препаратов из *Penicillium roqueforti*, которая в кратком виде с учетом традиционных режимов, действующих в классических технологиях переработки сыворотки и ферментной промышленности, приведена на рис.2.

Проведено комплексное изучение полученного ферментного препарата из *Penicillium roqueforti* и, в частности, ферментативные свойства, т.е. активность к различным субстратам, оптимальные температуры и pH гидролиза, pH и термостабильность, воздействие специфических ингибиторов, фракционный и аминокислотный состав, токсико-гигиеническая оценка и стойкость в хранении. Данные по активности препарата приведены в табл.3.

Таблица 3

Форма препарата	Активность					
	Протеолитическая		Липолитическая		Коагуляционная	
	КЕ/см <sup>3</sup>	КЕ/1г с.в.	Е/см <sup>3</sup>	Е/1г с.в.	Е Б-жа/ 1 г с.в.	Е Б-жа/ мг белка
Неочищенный препарат Г2х	20	1000	350	18000	35	0,09
УФконцентрат Г2	60	6000	400	20000	56	0,21
Сухой препарат Г2х	-	20000	-	20000	34	0,09

Установлено, что амилолитической активностью ферментный препарат не обладает. Выяснено, что при гидролизе таких субстратов, как эдестин и казеин оптимальной температурой является 35 °С, а гемоглобина - 40 °С. Максимум протеолитической активности при гидролизе казеина и гемоглобина проявляется в двух диапазонах pH, соответственно: 4,5-5,2 /максимум при 5,0/; 6,5-9,0 /максимум при 8,0/ и 3,0-4,0 /максимум при 3,8/; 4,4-5,5 /максимум при 5,0/. Ферментный

препарат обладает pH-стабильностью в границах /6,0 - 8,5/pH и термостабильностью при диапазоне температур 20-25 °С.

Исследование фракционного состава ферментного препарата показало, что он представляет собой сложную гетерогенную систему и содержит 9 фракций, различающихся электрофоретической подвижностью.

Очистка препарата методом "batch"-сепарирования на геле СМ-Сефадекс С-50 с последующим электрофорезом позволила установить наличие 2-х основных фракций, составляющих 89 % от их общего количества. Путем обработки специальными ингибиторами /пепстатином, 2-изопропилофлуорофосфораном и ЭДТА/ выявлено, что в препарате преобладают эндопептидазы, которые относятся к сериновым протеиназам /класс 3.4.21/, а также присутствует металлопротеиназа /класс 3.4.24/ в значительно меньших количествах.

Аминокислотный состав препарата содержит Лиз<sub>5</sub>, Гис<sub>3</sub>, Арг<sub>4</sub>, Асп<sub>36</sub>, Треон<sub>28</sub>, Сер<sub>38</sub>, Глю<sub>28</sub>, Алан<sub>23</sub>, Вал<sub>22</sub>, Мет<sub>5</sub>, Изолей<sub>8</sub>, Лей<sub>19</sub>, Тир<sub>14</sub>, Фен<sub>19</sub>, Трип<sub>4</sub>. Молекулярная масса находится в пределах 30 кДа.

Токсико-гигиеническая оценка препарата показала отсутствие в нем афлатоксинов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>, а массовая доля тяжелых металлов /Hg, As, Zn, Cu, Cd, Pb/ не превышает значения, установленные Институтом Гигиены для ферментных систем. Следовательно, препарат полностью соответствует медико-биологическим требованиям и является безвредным при использовании его в пищевых отраслях.

Ферментный препарат в виде раствора при температуре 5 °С сохраняет 100 %-ную активность через 2 недели хранения, по истечении 6 недель теряется 37 % активности, а после 7 недель хранения препарат теряет активность на 70 %.

Высушенный препарат сохраняет свои свойства в течение 12 месяцев. Хорошо хранится в течение 3-х месяцев концентрат препарата /сгущенный в 5 раз/ с поваренной солью при ее массовой доле в нем 15 %.

Анализ механизма действия сериновых протеиназ /трипсина, химотрипсина, эластазы и др./ и металлопротеиназ, а также исследования, изложенные выше, дают основание утверждать о перспективности их использования для гидролиза белковых веществ животного и растительного происхождения, что значительно расширяет возможный спектр применения ферментного препарата при переработке растительного сырья.

В четвертой главе "Использование протеолитического ферментного препарата из плесени гриба *Penicillium roqueforti*

в молочной, мясной и рыбной промышленности" описана разработка новых и совершенствование традиционных технологий производства мясных, молочных и рыбных продуктов высокого качества и пищевой ценности путем ферментативной обработки на различных стадиях технологического процесса.

На начальном этапе проведены исследования по использованию ферментного препарата по основному назначению, т.е. в производстве сыра Рокфор с целью получения безплесневого продукта. Рассмотрено 13 вариантов получения сыра, отличающихся между собой концентрацией препарата /0,5-8,0 КЕ/г сыра/, его видом /жидкий, концентрированный и сухой/, а также операцией внесения в сыр /через 7 и 14 дней после формирования сырной массы/.

Как показали проведенные исследования наиболее приемлемыми с точки зрения органолептических показателей готового продукта и интенсификации технологического процесса в целом являются 3 варианта: I вариант - внесение отцентрифугированной культуральной жидкости в сыр через 7 дней после формирования; II вариант - внесение УВ концентрата культуральной жидкости через 7 дней после формирования и III вариант - внесение УВ концентрата через 14 дней после формирования сырной массы. Концентрация фермента во всех вариантах - 8,0 КЕ/г сырной массы.

О целесообразности производства безплесневого сыра по этим вариантам свидетельствуют данные изменения показателя зрелости в ходе созревания в сравнении с сыром, выработанным классическим способом, которые представлены в табл.4.

Таблица 4

Варианты технологии	Показатель зрелости сыра, %									
	Продолжительность созревания, недель									
	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Классический способ	11,47	14,20	29,33	34,56	44,37	47,11	54,02	57,71		
I вариант	-	29,94	32,93	41,15	46,18	-	51,12	56,73		
II вариант	-	31,12	36,15	43,07	47,45	52,97	58,12	67,48		
III вариант	-	-	33,11	-	47,41	49,78	53,25	58,35		

Изучен также характер образования свободных жирных кислот /уксусной, масляной, капроновой, каприловой, каприновой и др./ в процессе созревания сыра, полученного по приведенным вариантам.

Установлено, что липолиз молочного жира при внесении фермент-

ного препарата происходит более интенсивно, с образованием несколько в больших количествах свободных жирных кислот с углеродными цепочками средней длины /4:0; 6:0; 8:0/. Другие жирные кислоты /2:0; 3:0; 5:0; 10:0/ образуются практически в идентичных количествах, что и в контрольном образце.

Сенсорная оценка показала, что сыры имеют более выраженный вкус и более восприимчивый массовым потребителем внешний вид из-за отсутствия в них плесени. Кроме того, внесение УВ концентрата препарата позволяет сократить срок созревания сыра на I неделю.

На основании проведенных исследований разработана ИТД на производство безплесневого сыра Рокпол, который вырабатывается молочными предприятиями Польши.

Проведены исследования по использованию препарата в производстве твердых сыров /группа голландского сыра/. Ферментный препарат добавляли в сырную массу путем шприцевания в процессе формирования в количестве 1,5-15 КЕ/г сыра. Было установлено, что превышение концентрации препарата 10 КЕ/г сырной массы приводило к получению сыра с ярко выраженными органолептическими пороками. Внесение же протеолитических ферментов в количестве 1,5-10 КЕ/г сырной массы обеспечивало сокращение сроков созревания на 1-2 недели за счет интенсификации биохимических процессов и получения голландского сыра с высокими органолептическими показателями.

На основании полученных результатов разработано и внесено изменение в технологическую инструкцию по производству голландского сыра, предусматривающее применение ферментного препарата из *Penicillium roqueforti* для интенсификации процесса его созревания.

В рационе питания населения Польши определенная роль отводится диетическим творожным сырам, в частности, творогу Рокпольского, процесс созревания которого заключается в пептонизации казеина под воздействием плесени *Penicillium roqueforti*. Изучена возможность замены названной плесени ее ферментным препаратом на стадии созревания творога. Установлено, что внесение препарата в творожную массу в количестве 20 % с концентрацией 10 КЕ/г творога и в виде смеси фермента с солями  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{CaCO}_3$  приводит к значительной интенсификации процесса созревания. Так, в первом случае требуемая зрелость сыра была достигнута через 7 дней, во втором - через 9 дней, в то время как контрольный образец был готов к употреблению только через 11 дней. Кроме того, в творожных сырах, полученных с участием препарата, отмечено улучшение органолептических показателей, в частности, вкуса, запаха, консистенции и

4018074  
ОНАХТ  
БІБЛІОТЕКА

внешнего вида.

Разработаны новые рецептуры творога Рокпольского, а его технология апробирована в условиях Вроцлавского молочного завода.

Ферментный препарат из *Penicillium roqueforti* нашел применение в производстве пептонизированных безалкогольных и слабоалкогольных молочных напитков. Установлено, что внесение препарата в молоко в количестве 1-2 мг% с последующим ферментированием при 35 °С в течение 24-30 часов приводит к коагуляции и пептонизации белков молока.

Внесение в сквашенное молоко в соответствии с разработанными рецептурами вкусовых наполнителей /ванильный сахар, клубничный джем/ с последующей гомогенизацией /  $t = 60-70$  °С,  $P = 0,5-1,0$  МПа/ позволяет получить напитки, обладающие целебными свойствами, которые рекомендованы Министерством здравоохранения Польши для употребления лицами, страдающими диспепсией, в качестве оздоравливающих препаратов.

С целью повышения пищевой ценности реализуемых в настоящее время на польском рынке слабоалкогольных молочных напитков изучена возможность использования для этой цели коагулированного и пептонизированного молока или пахты в соответствии с ранее изложенными параметрами ферментативной обработки. Для повышения стабильности белков и придания продукту специфических вкусовых свойств в исходное молоко добавляли 0,2 % хмеля по аналогии с производством пива. Затем молоко ферментировали и пастеризовали с целью инактивации протеолитического препарата. В пептонизированное молоко вносили сахарозу в виде 72 % сиропа или его заменители /картофельный сироп, искусственный мед/ в количестве, обеспечивающем ее 9 %-ое содержание, и минеральные соли для повышения эффективности спиртового брожения: / $Mg_3P_2O_4 \cdot 3H_2O - 0,5$  %;  $K_2PO_4 - 0,25$  %, а также 0,3 % пивных дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*. После 24 часовой ферментации дрожжи отделяют путем центрифугирования /6000 об/мин,  $C = 15$  мин/. Полученный очищенный продукт, названный "Молочным пивом", следует хранить не более 48 часов.

Рассмотрен также вариант добавления в пептонизированное с хмелем молоко этилового спирта, рома и вермута в количествах, обеспечивающих массовую долю этанола в продукте 1,0-1,5 %. Такие напитки также требуют реализации в течение 48 часов. Технология этих напитков внедрена на Вроцлавском молочном заводе.

Важной отраслью для возможного применения ферментного препа-

рата является мясная промышленность. Исследования в данной области проводили по четырем направлениям: 1/ изучение действия препарата на свойства мяса крупного рогатого скота в процессе его посолки; 2/ использование препарата в производстве ветчины из говядины; 3/ ферментативная обработка побочных продуктов убоя - вымени, трахеи, сычугов и ахиллесовых сухожилий; 4/ использование ферментированных побочных продуктов убоя в виде добавок в фаршевые изделия и кулинарные наборы.

В табл. 5 приведены данные об изменении физико-химических показателей мяса в процессе посолки с участием ферментного препарата.

Таблица 5

Продолжительность посолки час	Без препарата /контроль/					С препаратом				
	pH	водо-удерживающая способность %	ОВ по-циал МБ	эмульг. способность, см <sup>3</sup> /100 мг	степень гидролиза белков, %	pH	водо-удерживающая способность %	ОВ по-циал МБ	эмульг. способность, см <sup>3</sup> /100 мг	степень гидролиза белков, %
0	6,35	93,69	226	127,42	8,02	6,35	93,69	226	127,42	8,02
48	6,21	84,54	94	81,81	33,20	6,56	98,83	70	111,88	39,16
72	6,25	86,28	82	104,24	37,69	6,61	103,40	63	139,30	48,17
96	6,29	88,69	62	123,00	41,00	6,69	114,83	50	138,70	56,27
120	6,32	89,20	-	91,28	46,84	6,79	116,90	-	143,90	64,29
144	-	-	-	87,95	50,29	-	-	-	155,50	71,14
168	-	-	-	108,96	52,56	-	-	-	141,40	77,77

Как видно из таблицы, почти все показатели под действием ферментного препарата претерпевают существенные изменения, которые являются положительными /степень гидролиза и эмульгирующая способность/ для технологии мясных продуктов.

Также установлено, что при варке ферментированного мяса потери массы и степень его усадки в сравнении с контролем заметно снижаются. Это дает основание утверждать, что использование ферментированного в процессе посолки мяса говядины в технологии вареных и варено-копченых колбасных изделий обеспечивает повышение выхода готовой продукции.

Интересными являются результаты, полученные при изучении влияния ферментативной обработки на изменение степени реагирования красителей и цвета мяса в процессе его посолки. Было установлено,

БИБЛИОТЕКА  
ОНУХЛ

что степень реагирования красителей может быть описана аналитической зависимостью с помощью известного уравнения Борнса:

$$P = A \cdot R_0 (1 - a^{-at - qt}) \quad / I /$$

где  $P$  - степень реагирования красителей;  $A$  - постоянная;  $R_0$  - редуцированность мяса перед посолкой;  $a$  - коэффициент скорости проникновения в мясо редукторов;  $q'$  - коэффициент скорости распада нитрозокрасителей;  $t$  - время посолки.

Вычисленные на основании экспериментальных данных величины, входящие в уравнение / I /, приведены ниже:

Образцы	A	$R_0$ мг% ци- стина	a, час <sup>-1</sup>	q', час <sup>-1</sup>	$t_{max}$ час	$P_{max}$ %	Кoeffици- ент корре- ляции
без препа- рата	3,224	211,94	$4,864 \cdot 10^{-3}$	$1,689 \cdot 10^{-2}$	52,03	63,45	- 0,982
с препа- ратом	14,659	212,41	$4,460 \cdot 10^{-3}$	$1,992 \cdot 10^{-2}$	42,30	73,43	- 0,991

С помощью уравнения / I / определена оптимальная продолжительность посолки /  $t_{max}$  / при наибольших значениях степени реагирования красителей, т.е. конверсии общих красителей в нитроокрасители /  $P_{max}$  /. Отсюда следует, что ферментативная обработка позволяет сократить процесс посолки на 6,73 часа за счет изменения гистологической структуры тканей и ускорения процесса диффузии составляющих рассола в мясо. Полученные результаты подтверждены данными, свидетельствующими о повышении сохранности цвета ферментированного посоленного сырого и вареного мяса в сравнении с контрольными образцами.

Основываясь на изложенных результатах, разработана технология ветчины из говядины, краткая схема которой приведена на рис.3.

Установлено, что ветчина, выработанная по предлагаемой технологии, имеет лучшие характеристики /мягкость, нежность/, так как ее напряжение сдвига / $\sigma_{70}$  / имеет более низкие значения, чем у ветчины, полученной без участия ферментов.

Кроме того, отмечено, что ферментативная обработка мяса способствует снижению содержания канцерогенных веществ /остаточных нитратов и нитритов/ в готовом продукте, что объясняется сдвигом pH мяса в нейтрально-щелочную сторону, при котором большее количество соединений  $HNO_2$  будет превращаться в  $HNO_3$ . Сенсорная оценка ветчины показала, что продукт, выработанный с участием препа-

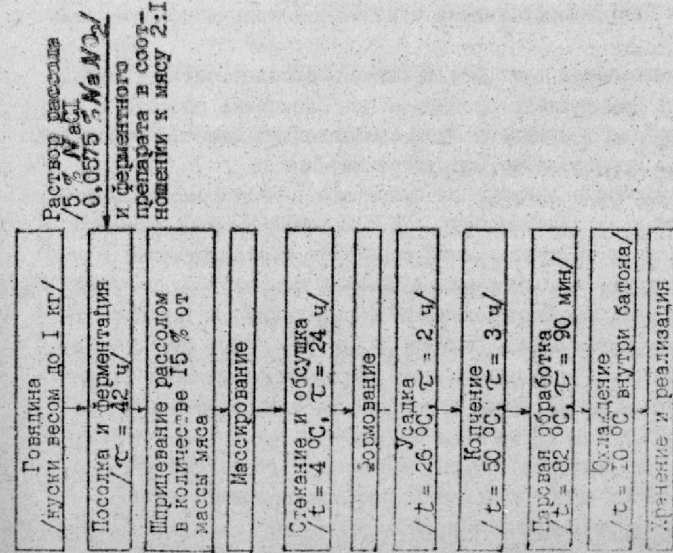


Рис.3. Технологическая схема производства ветчины из говядины

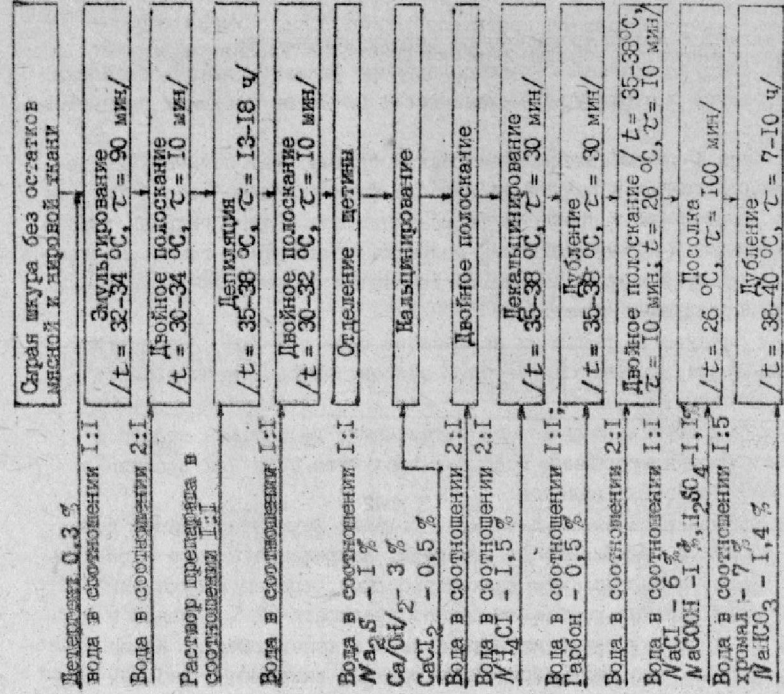


Рис.6. Технологическая схема производства кожи из свиных шкур

продукт является более ароматным по запаху копчености.

На следующем этапе изучалось влияние ферментативной обработки на гистологию и структурно-механические свойства побочных продуктов убоа.

На рис.4 представлены электросканограммы гистологических срезов вымени, трахеи и сычуга до и после ферментативной обработки, из которых видно, что в процессе ферментации происходит гидролиз волокон, приводящий к значительному разрушению животной ткани. Подтверждением этому являются данные об изменении структурно-механических свойств исследуемых объектов.

Как следует из рис.5 их напряжение сдвига  $\sigma_{70}$  под действием препарата заметно снижается и зависит от продолжительности его воздействия.

Руководствуясь полученными сведениями, рассмотрен вопрос о включении ферментированных побочных продуктов убоа как добавок в фаршевые и колбасные изделия.

На основании анализа данных по влиянию ферментированных добавок на липкость, стабильность эмульсии, напряжение сдвига и рН колбасного фарша выявлено, что количество вымя, трахеи и сухожилий в производстве вареных колбас не должно превышать 10% в связи с ухудшением их органолептических показателей и консистенции. Кроме того, определено, что полуфабрикатные наборы, включающие добавку ферментированного сычуга, достигали своей готовности при 2-х часовой варке, тогда как без ферментативной обработки — только по истечении 3 часов.

Обобщение изложенных выше результатов позволяет сделать вывод, что использование ферментного препарата при обработке побочного мясного сырья позволяет привлечь этот сравнительно дешевый источник животных белков в производство продуктов питания.

Изучена возможность применения препарата в производстве высококачественной кожи из свиных шкур. На основании выполненных исследований по влиянию ферментативной обработки в стационарных и динамических условиях, концентрации фермента, температуры инкубирования, pH раствора, продолжительности ферментации, а также добавок химических веществ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{NaHSO}_4$  и роданида аммония/ было установлено, что ферментный препарат обладает только депиляционным эффектом и не оказывает положительного воздействия на стадии дубления свиных шкур.

Руководствуясь результатами экспериментов, разработана технология кожи из свиных шкур, которая в виде схемы приведена на рис.6. Технология апробирована в производственных условиях Институ-

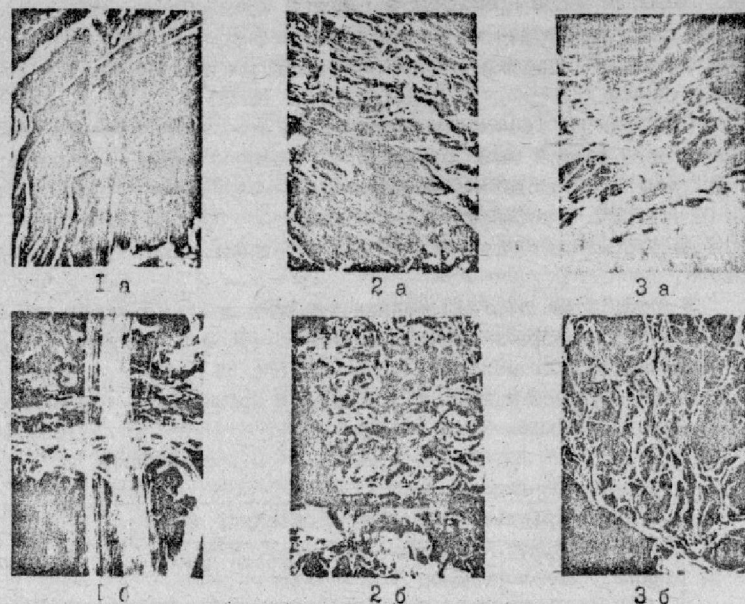


Рис.4. Сканограммы побочных продуктов убоа  
1 — вымя; 2 — трахея; 3 — сычуг  
а, а' — до и после ферментативной обработки.

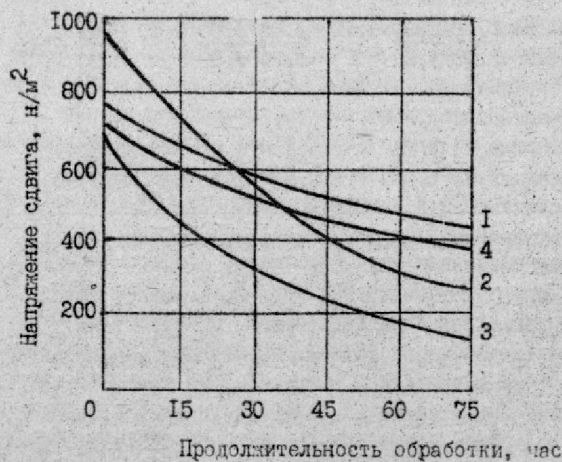


Рис.5. Изменение структурно-механических свойств побочных продуктов убоа в процессе ферментативной обработки  
1 — ахилловы сухожилия;  
2 — трахея;  
3 — вымя;  
4 — сычуги.

те пищевой промышленности в г. Лодзе. Преимущества этой технологии состоит в сокращении процесса выделки шкур на 2-4 часа и снижении количества используемых экологически вредных  $/Na_2S/$  и химических веществ  $/Na_2CO_3; NH_4Cl; Ca(OH)_2; NaOH/$ .

Принимая во внимание положительные стороны применения препарата при переработке белоксодержащего животного сырья, содержащего мышечную ткань, проведены аналогичные эксперименты по ферментативной обработке рыбы и морепродуктов. Воздействию протеолитического препарата подвергались сельдь балтийская, ставрида, кальмары, камбала и плотва.

В табл. 6 представлены данные динамики процесса гидролиза белков в процессе созревания исследуемых образцов с участием ферментного препарата в технологии сельди балтийской соленой, ставриды маринованной в уксусе и камбалы копченой в сравнении с контрольными образцами.

Таблица 6 x/

Показатели	Продолжительность созревания, суток											
	Сельдь балтийская			Ставрида маринованная			Камбала копченая			Кальмары		
	0	7	14	0	7	14	0	7	14	0	7	14
Общий азот, %	3,29	1,54	1,34	3,48	2,99	1,94	2,62	1,27	1,10	2,96	1,34	1,14
		1,56	1,34		2,23	1,88		1,31	1,25		1,37	1,18
Аминовый азот, %	1,82	2,06	2,52	0,56	1,12	2,00	0,42	0,45	4,90	0,49	0,49	0,56
		2,10	3,64		1,68	1,33		0,70	9,80		6,80	1,01
Степень гидролиза, %	-	13,13	18,81	-	3,73	3,89	-	5,4	14,5	-	36,9	49,1
		13,53	27,17		7,53	7,10		53,4	78,4		49,6	85,5

x/ в числителе - контрольные образцы; в знаменателе - образцы, подвергнутые ферментации.

Анализ данных таблицы показывает, что добавка фермента интенсифицирует процесс гидролиза белка рыбных тканей. Об этом также свидетельствует выявленное изменение содержания свободных аминокислот в сельди балтийской, приводящее к 4-х кратному их приросту, в основном, за счет увеличения массовых долей лизина, лейцина, валина, аланина, гистидина и аспарагина, в то время как в контрольных обра-

зцах имело место только 2-х кратное повышение. Дополнительным подтверждением выявленному факту являются полученные экспериментальные данные по влиянию ферментативной обработки на структурно-механические свойства рыбной ткани, которые позволили установить ярко выраженную тенденцию увеличения глубины погружения пенетрометра в рыбные ткани, подвергнутые действию препарата в процессе их созревания, в сравнении с продуктами, полученными по традиционной технологии. Органолептическая оценка рыбных продуктов показала, что изделия, выработанные с участием ферментного препарата, имеют лучшие показатели.

Добавка ферментного препарата в раствор, используемый в производстве плотвы пикантной с овощами, и выдержка ее в нем в течение 5 суток обеспечивает 4-х кратное уменьшение усилий  $/с 15,6 до 3,9 кг/см^2/$  по снятию луски с поверхности продукта.

Глава пятая "Технологические основы использования продуктов биосинтеза грибной плесени *Penicillium roqueforti* в производстве кормов и других продуктов" посвящена разработке технологий и рекомендаций по применению ферментного препарата и грибной биомассы в пивоваренной, комбикормовой и химической промышленности.

Вначале изучено влияние ферментативной обработки препаратом на гидролиз отходов зерноперерабатывающей промышленности и кератиновой муки. Установлено, что ферментирование в течение 48 часов, температуре 37 °C и добавке жидкого препарата к названному сырью в соотношении 1:4 позволяет повысить степень гидролиза белков отрубей пшеницы, ячменя, овса и кератиновой муки на 18,31; 7,27; 3,86 и 2,73 % соответственно. При этом переваримость *in vitro* возрастала на 9,78; 19,81; 11,23 и 17,14 % соответственно, что свидетельствует о повышении их кормовой ценности.

Для подтверждения повышения кормовой ценности проведены зоотехнические опыты, позволяющие судить о переваримости *in vivo*, по вскармливанию кормовых смесей для птиц DKF, вырабатываемых Вроцлавским комбикормовым заводом с добавками 0,1-0,6 % грибной биомассы. Основанием для использования биомассы послужили данные, свидетельствующие о схожести ее химического и аминокислотного состава со смесью DKF. Выявлено, что у цыплят, употребляющих смесь с биомассой, по мере увеличения ее содержания повышается переваримость безазотистых веществ при одновременном снижении переваримости жира. Выполненный баланс азота и степени задержки аминокислот показал, что в большей степени, в особенности последние, усваиваются организмом цыплят, вскормленных смесью с биомассой.

Так, добавление 0,6 % биомассы увеличивает степень задержки аминокислот от 0,4 до 8,1 % в сравнении с контрольной группой цыплят.

Анализ данных по расходу кормов, привесу, а также послеубойного выхода мяса, жира и внутренностей позволил сделать вывод, что добавка биомассы приводит к снижению расхода кормов на 2-8 % при одинаковом убойном выходе, однако, несколько снижает массовую долю жира в мясе на 10-20 % и массу внутренностей, что в общем является положительным фактором.

В дальнейшем изучалась возможность повышения кормовой ценности осадков бражки пивоваренного производства, ее смеси с жомом, а также смеси жомы и картофельной вытерки как источников кормового белка. Установлено, что ферментативная обработка увеличивает степень гидролиза белка осадков бражки на 6,93-7,74 % и переваримость с 46,2 до 58,54 %. Оптимальными режимами ферментирования осадков является температура 30-40 °С, продолжительность 5-10 дней при их соотношении с раствором препарата 2:1. Также установлено, что ферментативная обработка осадков бражки, жомы, картофельной вытерки и их смеси жидкофазным и поверхностным способом путем внесения раствора препарата или грибной плесени *Penicillium roqueforti* приводит к значительному росту биомассы, а, следовательно, и кормового белка. Содержание последнего увеличивается на 4,74-26,83 %. Это открывает новые перспективы по использованию *Penicillium roqueforti* в производстве микробного кормового белка.

Основываясь на изложенных выше результатах, были разработаны технологии и рецептуры кормовых смесей для птиц и кормов для свиней и крупного рогатого скота, которые приведены в виде кратких схем на рис.7 и рис.8 соответственно.

В настоящее время кормовая смесь для птиц вырабатывается на Вроцлавском комбикормовом заводе.

Изучена возможность использования препарата для повышения стабильности пива, т.е. увеличения сроков его хранения до выпадения в нем осадков. Установлено, что оптимальной концентрацией препарата с точки зрения вкусовых и ароматических показателей является 0,2 %. При этом пиво может храниться при температуре 4 °С в течение 2-х месяцев.

Рекомендации, сформулированные автором, нашли реализацию на Вроцлавском пивзаводе на стадии процесса осветления пива, они обеспечивают повышение стабильности коллоидной системы и позволяют сократить расход протеолитического препарата, закупаемого для этих целей по импорту.

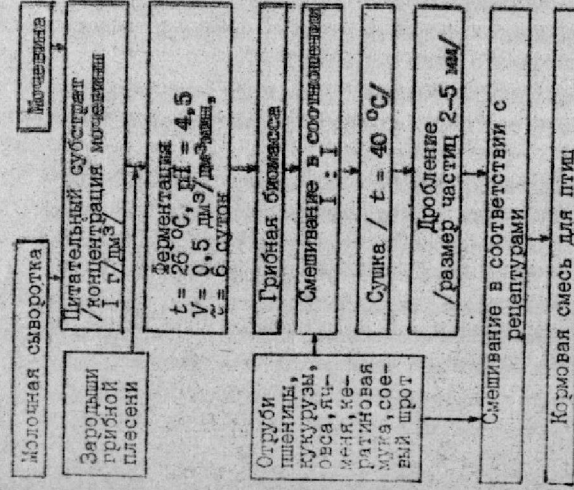


Рис. 7. Технологическая схема производства кормовых смесей для птиц

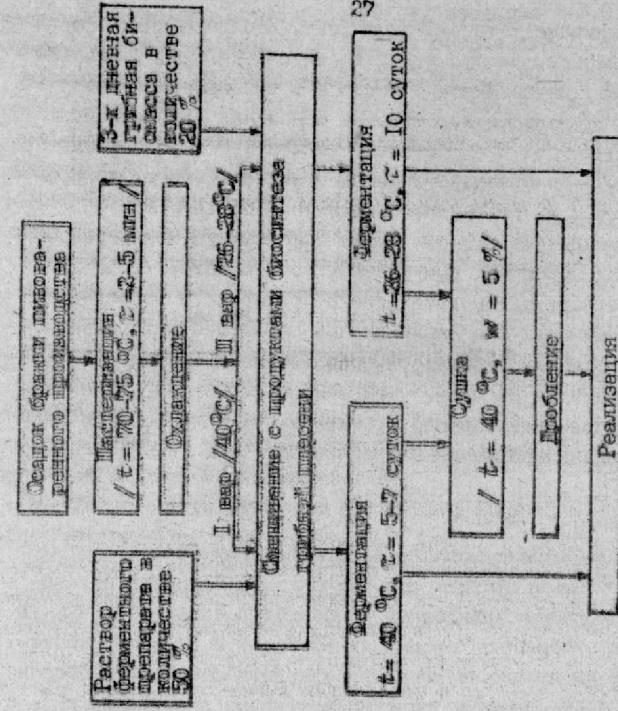


Рис. 8. Технологическая схема производства кормов из отходов пивоваренного производства

Принимая во внимание установленный факт, что выделенный ферментный препарат обладает не только протеолитической, но и липолизической активностью, изучена возможность его использования как энзимной добавки в стиральные порошки. На основании изучения его свойств и их изменения под воздействием температуры и рН порошка было установлено, что он обладает лучшими характеристиками по сравнению с импортируемым из Голландии препаратом "MAXATASE". Это позволяет рекомендовать его как более эффективную энзимную добавку для стиральных порошков, выпускаемых во Вроцлаве.

Добавление раствора протеолитического препарата в водопроводную воду, используемую для мацерации ржаных зародышей питательной среды в производстве молочной кислоты, обеспечивает сокращение процесса ее биосинтеза на 24 часа, уменьшение источников органического азота в рецептуре питательного субстрата с 1,0 до 0,5 % и значительную интенсификацию образования сахарозы.

#### Выводы

1. При получении ферментного препарата из промышленного штамма грибной плесени *Penicillium roqueforti* в качестве питательного субстрата следует использовать безбелковую кислотно-сычужную молочную сыворотку, которая по своему химическому и солевому составу не требует дополнительного обогащения энергетическими веществами и микроэлементами и обеспечивает высокоэффективное проведение процесса биосинтеза микробных протеаз.

2. Определены оптимальные условия /температура, рН, количество подаваемого воздуха/ биосинтеза высокоактивных вне- и внутриклеточных протеаз и максимального прироста грибной биомассы *Penicillium roqueforti*.

Доказано, что ультрафильтрационная обработка культуральной жидкости повышает степень чистоты и активность синтезируемых протеаз.

Разработана технологическая схема производства, обеспечивающая получение высокоэффективных жидких, концентрированных и сухих протеолитических ферментных препаратов из грибной плесени *Penicillium roqueforti*.

3. Всесторонне изучены химический, аминокислотный, фракционный состав, ферментативные свойства /протеолитическая, липолизическая, коагуляционная активности и активность к различным белковым субстратам/, рН и термостабильность, воздействие специфических ингибиторов и стойкость в хранении различных форм ферментного препарата.

Установлено, что препарат является сложной гетерогенной системой с преобладающим содержанием эндолептидаз, классифицируемых как сериновые протеиназы /класс 3.4.21/, а также металлопротеиназы /класс 3.4.24/, находящихся в значительно меньших количествах.

Токсико-гигиеническая оценка показала, что препарат является безвредным при использовании его в пищевых отраслях.

4. На базе современных представлений о механизме действия сериновых протеиназ и металлопротеиназ определены основные области применения препарата в агроперерабатывающих и других отраслях производства товаров народного потребления.

5. Установлено, что использование препарата в производстве сыра Рокфор, голландского сыра и твердого сыра Рокпольского позволяет интенсифицировать технологический процесс и сократить сроки их созревания.

Разработана технология безплесневого сыра Рокпол и внесены изменения в действующие технологические инструкции по производству голландского сыра и творога Рокпольского.

Выявлено, что ферментативная обработка препаратом молока позволяет получить пептонизированные молочные напитки, обладающие лечебными свойствами, для лиц, страдающих диспепсией, а также повысить пищевую ценность слабоалкогольных молочных напитков.

6. Доказано, что ферментативная обработка говядины и побочных продуктов убоя скота /вымя, трахея, сычуг, ахиллосы сухожилия/ приводит к гидролизу белков мышечной ткани, способствует улучшению их технологических и структурно-механических свойств, снижает содержание канцерогенных веществ /остаточных нитратов и нитритов/ в готовых изделиях, приводит к улучшению органолептических показателей и пищевой ценности. Разработана интенсифицированная технология ветчины из говядины. Сформулированы рекомендации и разработаны рецептуры производства фаршевых и колбасных изделий и полуфабрикатов с добавками побочных продуктов убоя.

Установлено, что ферментный препарат обладает хорошим депиляционным эффектом при выделке свиных шкур. Разработана технология высококачественной кожи, обеспечивающая сокращение процесса выделки свиных шкур и повышение экономичности производства.

7. Изучены особенности процесса созревания и посолки рыбы и морепродуктов с участием ферментного препарата. Установлено, что обработка препаратом позволяет сократить длительность технологического процесса и повысить органолептические показатели готовой продукции. Разработаны и внесены изменения в нормативно-техническую документацию на производство сельди балтийской соленой, став-

риды маринованной, камбалы копченой, кальмаров и плотвы пикантной с овощами.

8. Установлено, что ферментативная обработка отходов зерноперерабатывающей, крахмало-паточной, пивоваренной промышленности и кератиновой муки позволяет повысить их кормовую ценность. Разработаны технологии кормовых смесей для птиц и кормов для свиней и крупного рогатого скота.

Доказана возможность и сформулированы рекомендации по использованию ферментного препарата в производстве стойкого в хранении пива, стиральных порошков с энзимными добавками, а также для интенсификации процесса биосинтеза в производстве молочной кислоты.

9. В результате выполненных теоретических и экспериментальных исследований предложен ряд технических решений, новизна которых подтверждена 8 патентами Польши и 2 заявками с положительным решением. Некоторые из патентов закуплены предприятиями.

С целью их реализации в производство большинство разработанных технологий внедрены или апробированы в промышленных условиях.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Шолтысек К., Мишкевич Т., Чагаровский А.П. Применение ультрафильтрации в технологии ферментных препаратов. Тез. докл. 53 научной конференции ОТИПН. - Одесса - 1993.
2. Krezlewicz H., Stachowicz K. "Metoda oznaczania kwasowosci czynne mleka jako jedyna metoda adekwatnie odzwierciedlajaca przebieg procesu samokwaszenia mleka". Przegląd Mleczarski, (4), 1974.
3. Krezlewicz H., Stachowicz K. "Próba zastosowania metody formolowej do oznaczania ogólnej zawartości białka w mleku". Prace Naukowe WSE we Wrocławiu, (52), 1974.
4. BLASZKOW W., Miskiewicz T., Stachowicz K., Bolach E. "Jakosciowe aspekty dodatku aromatu w produkcji utrwalonego soku pitnego". Prace Naukowe WSE we Wrocławiu, (52), 21974.
5. Krezlewicz H., Szoltysek K. "Szybka metoda oznaczania wody w serze". Przemysł Spożywczy, (12), 1974.
6. Krezlewicz H., Szoltysek K. "Możliwości wykorzystania do produkcji fermentowanego napoju mlecznego typu kefir grzybków tzw. tybetanskich". Przegląd Mleczarski, (10), 1974.
7. Krezlewicz H., Szoltysek K., Maskos W. "Badania nad przyspieszeniem procesu dojrzewania sera pleśniowego rokpól". Przemysł Spożywczy, (1), 1975.
8. Krezlewicz H., Szoltysek K. "Produkty mleczne grodlem witaminy C". Przegląd Mleczarski, (1), 1975.
9. Szoltysek K., Gajos E. "Przedłużenie przydatności konsumpcyjnej ciasta biszkoptowego". Przegląd Piekarski i Cukierniczy, (11), 1975.

10. Solinski J., Szoltysek K., Nysler W. "Próba zastosowania aparatu Pro-Milk do oznaczania białka w soku ziemniaka i koagulatach ziemniaczanych". Prace Naukowe WSE we Wrocławiu, (116), 1977.
11. Szoltysek K. "Próba zastosowania preparatu pleśniowego jako dodatku do twarogu homogenizowanego". Przegląd Mleczarski, (7), 1976.
12. Szoltysek K., Tomczak E. "Próba wykorzystania aparatu Pro-Milk do oznaczania frakcji białkowej azotowych związków rozpuszczalnych w serze. Część 1. Przegląd Mleczarski, (3), 1977.
13. Szoltysek K., Jurzyk T. "Ocena grzybni Aspergillus niger i Penicillium roqueforti jako ewentualnych składników mieszanek paszowych". Przegląd Hodowlany, (210), 1977.
14. Szoltysek K. "Kazeina i hemoglobina jako substraty do oznaczania aktywności proteolitycznej". Prace Naukowe AE we Wrocławiu, (167), 1980.
15. Szoltysek K. "Próba przyspieszenia procesu dojrzewania sera pleśniowego rokpól". Zeszyty Problemowe Posterów Nauk Rolniczych, (243), 1980.
16. Szoltysek K. "Otrzymywanie i ogólna charakterystyka technicznego preparatu enzymów proteolitycznych z grzybni Penicillium roqueforti". Prace Naukowe AE we Wrocławiu, (191), 1982.
17. Szoltysek K. "Opracowanie optymalnych warunków hodowli wglebnej grzybni Penicillium roqueforti jako źródła enzymów proteolitycznych. Wpływ składu pożywki na biosynteze enzymów proteolitycznych". Prace Naukowe AE we Wrocławiu, (199), 1982.
18. Szoltysek K. "Toksyczne metabolity grzybni Penicillium roqueforti". Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 33, (1-2), 1982.
19. Szoltysek K., Tomczak E. "Próba wykorzystania aparatu Pro-Milk do oznaczania frakcji białkowej azotowych związków rozpuszczalnych w wodzie. Część 11; Przegląd Mleczarski, (4), 1982.
20. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Versuche zur beschleunigten Reifung des Schimmelkases Rokpol". Archiv für Lebensmittel Hygiene, 32, (2), 21981.
21. Szoltysek K., Wojtasik J. "Możliwości otrzymywania koncentratu żupu rybnej". Prace Naukowe AE we Wrocławiu, (236), 1983.
22. Krezlewicz H., Szoltysek K., Ziobrowski J. "Otrzymywanie tryptofanu z hydrolizatu kazeiny na drodze sorpcji z zastosowaniem Asmitu-529". Prace Naukowe AE we Wrocławiu, (255), 1983.
23. Kramarz M., Szoltysek K., Ziobrowski J. "Badania nad wykorzystaniem scieków z zakładu utylizacyjnego do hodowli drożdży przemysłowych". Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, (6), 1983.
24. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Wykorzystanie enzymów proteolitycznych grzybni Penicillium roqueforti do otrzymywania hydrolizatu białkowego jako przyprawy do potraw". Przegląd Mleczarski (4), 1984.
25. Szoltysek K., Wołoszyn J., Ziobrowski J. "Wykorzystanie enzymów proteolitycznych grzybni Penicillium roqueforti w procesie dojrzewania sędzia bałtyckiego (Clupea harengus)". Przemysł Spożywczy, (6), 1984.
26. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Możliwości produkcji sera rokpól z użyciem grzybni Penicillium roqueforti otrzymanej na drodze hodowli wglebnej na podłożu sawierajacym olej". Przegląd Mleczarski, (9), 1983.
27. Szoltysek K., Garncarek B., Garncarek Z., Ziobrowski J. "Możliwości karotenizowania produktów mleczarskich". Przegląd Mleczarski, (5), 1984.
28. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Możliwości otrzymywania bezpleśniowego wsera rokpól przy udziale preparatu enzymatycznego pleśni Penicillium roqueforti". Przemysł Spożywczy, (7), 1984.

29. Szoltysek K., Garncarek B., Garncarek Z., Ziobrowski J. "Biogogacenie mleka spozywczego w karsten". Przegląd Mleczarski, (11), 1983.
30. Szoltysek K. "Mozliwosci otrzymywania alkaloidow sporyzny metoda hodowli wglebnej". Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (278), 1984.
31. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Mozliwosci zastosowania preparatu enzymatycznego grzybni Penicillium roqueforti w produkcji srod-  
kow pioracych". Przemysl Chemiczny, (11), 1984.
32. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Zastosowanie preparatu enzymow pro-  
teolitycznych grzybni Penicillium roqueforti do zmiekczenia tk-  
nki ostroboka". Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (291), 1985.
33. Maslowski B., Szoltysek K., Ziobrowski J. "Mozliwosci zastosowa-  
nia enzymow proteolitycznych grzybni Penicillium roqueforti w  
procesie przygotowania pozrywki dla bakterii fermentacji mlekowe.  
Przemysl Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, (7), 1985.
34. Szoltysek K. "Adaptacja metody wg Ostrowskiego do oznaczania  
aktywnosci lipolitycznej enzymow plesniowych na przykladzie lipaz  
plesni Penicillium roqueforti". Prace Naukowe AE we Wroclawiu,  
(313), 1985.
35. Szoltysek K. "Opracowanie optymalnych warunkow hodowli wglebnej  
grzybni Penicillium roqueforti jako zrodla enzymow proteolitycz-  
nych. Wplyw niektórych czynnikow fizyko-chemicznych". Prace Nau-  
kowe AE we Wroclawiu, (291), 1985.
36. Szoltysek K., Miskiewicz T. "Proba hodowli grzybni Penicillium  
roqueforti na wyslodkach buraczanych i wycierce ziemniaczanej  
dla zwiekszenia ich wartosci jako skladnikow mieszanek paszo-  
wych". Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (291), 1985.
37. Fritz Z., Szoltysek K., Schleicher A., Jamroz D. "Przydatnosc  
paszowa grzybni Penicillium roqueforti oceniana w badaniu  
strawnosciowo-bilansowym na kurczetach". Zeszyty Naukowe WSR we  
Wroclawiu, 29, (162), 1986.
38. Szoltysek K., Gluchowska M. "Mozliwosci zastosowania metody pe-  
netrometrycznej do oceny wlasnosci reologicznych serow topionych  
w czasie ich przechowywania". Prace Naukowe AE we Wroclawiu,  
(359), 1986.
39. Kolaczowska M., Chrzanowska J., Jacyk A., Szoltysek K., Pola-  
nowski A. "Factor Affecting renning - light proteinase produc-  
tion by Fusarium moniliforme". Milchwissenschaft, 43, (2), 1988.
40. Szumilak K., Gudaszewski T., Szoltysek K. "Wplyw dodatku enzy-  
mow proteolitycznych grzybni Penicillium roqueforti na podwy-  
zszenie strawnosci pasz". Prace Naukowe we Wroclawiu, (435),  
1988.
41. Woloszyn J., Szoltysek K. "Zastosowanie preparatu enzymatyczne-  
go grzybni Penicillium roqueforti do zmiekczenia tkanki kalmara  
i fladry". Przemysl Spozycwczy, (7), 1988.
42. Woloszyn J., Szoltysek K., Ziobrowski J. "Zastosowanie prepara-  
tu enzymatycznego grzybni Penicillium roqueforti do odluszczenia  
ryby ploci". Przemysl Spozycwczy, (10), 1988.
43. Szoltysek K., Garncarek B. "Zastosowanie preparatu enzymatycz-  
nego z grzybni plesni Penicillium roqueforti w produkcji serow  
twarogowych dojrzewajacych". Przegląd Mleczarski, (4), 1988.
44. Szoltysek K., Garncarek B. "Zastosowanie preparatu enzymatyczne-  
go z grzybni plesni Penicillium roqueforti do przyspieszenia  
dojrzewania serow podpuszczkowych dojrzewajacych". Prace Naukowe  
AE we Wroclawiu, (476), 1989.
45. Maslowski B., Szoltysek K. "Zastosowanie preparatu proteolitycz-  
nego z grzybni Penicillium roqueforti do wydłużenia trwalosci  
piwa jasnego". Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (476), 1989.
46. Gudaszewski T., Lesiow T., Szoltysek K., Ziobrowski J. "Dzia-  
nia nad zastosowaniem preparatu enzymatycznego plesni Penicillium  
roqueforti w przetworstwie miesnym. Czesc 1. Wplyw prepara-  
tu enzymatycznego na wybrane wlasnosci technologiczne miesa  
bydlocego". Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (476), 1989.
47. Gudaszewski T., Lesiow T., Szoltysek K., Ziobrowski J. "Badania  
nad zastosowaniem preparatu enzymatycznego grzybni Penicillium  
roqueforti w przetworstwie miesnym. Czesc 11. Wplyw preparatu  
enzymatycznego na stopien przereagowania barwnikow miesa byd-  
locego". Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (476), 1989.
48. Szoltysek K., Garncarek B. "Zastosowanie preparatu enzymatycz-  
nego z grzybni plesni Penicillium roqueforti do otrzymywania  
mleka peptonizowanego". Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (490),  
1989.
49. Szoltysek K., Garncarek B. "Zastosowanie preparatu enzymatycz-  
nego z grzybni plesni Penicillium roqueforti do otrzymywania  
peptonizowanych napojow mleczych o niewielkiej ilosci alkoholu".  
Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (490), 1989.
50. Fritz Z., Jarosz L., Schleicher A., Szoltysek K., Jamroz D.  
"Zastosowanie grzybni Aspergillus niger oraz frakcjonowanego  
susu z lucerny w mieszanekach dla kurczat brojlerow". Roczniki  
Naukowe Zootechniki. Monografie i Rozprawy, (27), 1989.
51. Szoltysek K., Garncarek B., Garncarek Z., Woloszyn J. "Zastoso-  
wanie preparatu enzymatycznego z grzybni plesni Penicillium  
roqueforti do otrzymywania bezplesniowego sera rokol".  
Przegląd Mleczarski, (4), 1990.
52. Szoltysek K., Garncarek Z. "Wplyw kwasu gibberelinowego na  
wzrost grzyba Penicillium roqueforti i synteze enzymow proteo-  
litycznych". Prace Naukowe AE we Wroclawiu, (626), 1992.
53. Szoltysek K. Cwiczenia laboratoryjne technologii przemyslu  
spozycwego. Rozdzial 10, Przemysl Mleczarski. Skrypty AE we  
Wroclawiu, 1978.
54. Szoltysek K. Cwiczenia laboratoryjne technologii przemyslu  
spozycwego. Rozdzial 10, Przemysl Mleczarski. Skrypty AE we  
Wroclawiu, 1989.
55. Szoltysek K., Woloszyn J., Ziobrowski J. "Urządzenie do pomiaru  
sily odluskiwania ryb. Wzorzec uzytkowy nr. 80052 z dnia 1990-05-  
08.
56. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Sposob wytwarzania sera Typu  
roqueforti". Patent PRL nr. 117724 z dnia 1980-03-24.
57. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Sposob otrzymywania przyprawy do  
potraw". Patent PRL nr. \*133343 z dnia 1986-03-15.
58. Szoltysek K., Woloszyn J., Ziobrowski J. "Sposob enzymatycznej  
obrobki tkanki miesnej ryb". Patent PRL nr. 133344 z dnia  
1986-03-15.
59. Szoltysek K., Miskiewicz T., Ziobrowski J. "Sposob wytwarzania  
paszy dla zwierzat". Patent PRL nr. 133308 z dnia 1986-03-20.
60. Maslowski B., Szoltysek K., Ziobrowski J. "Sposob przygotowa-  
nia podloza do fermentacji mlekowej". Patent PRL nr. 133344 z  
dnia 1986-03-15.
61. Garncarek B., Garncarek Z., Szoltysek K. "Sposob otrzymywania  
trwalego preparatu do barwienia i witaminizowania produktow  
mleczarskich". Patent PRL nr. 137922 z dnia 1987-05-30.
62. Szoltysek K., Ziobrowski J. "Sposob wytwarzania paszy, zwiazacza  
paszy dla drobiu". Patent PRL nr. 137439 z dnia 1987-03-31.
63. Szoltysek K. "Sposob wytwarzania preparatu enzymatycznego z  
odbialzonej serwatki". Patent PRL nr. 150796 z dnia 1990-10-31.

64. Szoltysek K., Miskiewicz T. "Sposob wytwarzania paszy dla zwierzat". Zgloszenie patentowe nr. P-299 281, 1993-06-11.
65. Szoltysek K. "Sposob otrzymywania mleka peptonizowanego". Zgloszenie patentowe nr. 299 282 z dnia 1993-06-11.