

Сахалинский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии
(СахНИРО)



ПРИБРЕЖНОЕ РЫБОЛОВСТВО – XXI ВЕК

МАТЕРИАЛЫ
МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

19-21 сентября 2001 г.

Часть 2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТЕАЗ В ТЕХНОЛОГИИ ПАСТЫ ИЗ ИКРЫ МИНТАЯ

*Калиниченко Т.П.,
Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
г. Владивосток*

Установлено, что из некондиционной (перезрелой) икры минтая возможно получить продукт с пастообразной консистенцией на основе ферментирования сырья препаратом микробиального происхождения мегатерином Г 10Х. Показано, что образование пастообразной структуры продукта возможно при условии, что степень протеолиза составляет более 18%. Разработаны рациональные условия ферментализации, обеспечивающие требуемую степень протеолиза: доза фермента 300 ПЕ/1 кг ястыков, время ферментализации – 24 час. при температуре 6°C.

The paper shows the possibility of attaining a product with the paste-like consistence from the off-test (overripe) pollock eggs on the base of fermenting the primary products with the compound of microbiological origin – megaterine G 10X. The formation of the paste-like structure is possible when the level of proteolysis constitutes more than 18 %. Rational conditions for fermentolysis ensuring the required level of proteolysis are developed: a dose of ferment - 300 PE/1 kg of ovaries; time period for fermentolysis – 24 hours under the temperature 6°C.

Вследствие одновременного созревания разных особей в популяциях минтая некондиционная (перезрелая - V стадия зрелости) икра встречается во весь период лова. Получение качественной соленой пробойной продукции из некондиционной икры затруднено вследствие непрочности ее оболочек, что вызывает не только большие потери при пробивке, но и появление отстоя в готовой продукции. Технологии получения пастообразной продукции из этого сырья решают проблему увеличения выхода готовой продукции, поскольку предусматривают использовать ястыки некондиционной икры, исключая стадию пробивки. Белки пленок, покрывающих ястыки, а также оболочек икринок состоят на 30-40 % из коллагена. Основной проблемой при обработке такого сырья является разрушение до гомогенного состояния оболочек икринок и ястычных пленок. Этот процесс может быть осуществлен последовательным действием протеаз и гомогенизации, при этом возможно использование ферментов растительного, животного или микробиального происхождения.

Ранее нами установлено, что однородные гомогенаты из некондиционной икры минтая могут быть получены при условии протеолиза соединительнотканых белков икры под влиянием препаратов протеаз из гепатопанкреаса крабов или пилорических придатков лососевых (Калиниченко, 1997). Консистенция таких однородных гомогенатов является жидкой, и для получения из них паст требуется проведение пастеризации, при которой происходит коагуляция белков, или внесение структурообразователя.

Микробиальные протеолитические ферменты занимают приоритетные позиции на мировом рынке и рекомендованы к использованию в ряде отраслей пищевой, в том числе в рыбной, промышленности. В технологиях производства паст на основе рыбного сырья ферменты микробиального происхождения применяют для превращения белковых веществ (от 5 до 50 %) в растворимые (Eisgruber et al., 1995) или повышения связующей способности использованных продуктов (Пат. № 5518742). Анализ литературных данных показал: степень протеолиза под влиянием ферментов микробиаль-

ного происхождения столь глубока, что образующиеся азотсодержащие продукты гидролиза белков могут изменить реологические характеристики получаемых продуктов.

Целью настоящей работы явилось установление возможности использования препарата микробиального происхождения мегатерин Г 10Х в технологии паст из некондиционной икры минтая.

Объектом исследований служила мороженая некондиционная икра минтая со сроком хранения два мес. при температуре минус 20 °С и фермент микробиального происхождения мегатерин Г 10Х, полученный на Вышневолоцком заводе ферментных препаратов по ТУ 00479942-002-94 (опытная партия), а также экспериментальные образцы паст из икры минтая, полученные на основе ферментирования сырь.

Протеолитическую активность мегатерина определяли по методу Е.Д. Каверзневой (1971) на субстрате – казеинате натрия при рН 6,0-8,0, используя фосфатные буферы, и выражали в протеолитических единицах (ПЕ) на 1 г фермента. Для определения коллагенолитической активности проводили протеолиз желатина. 0,0125 %-ные растворы ферментов термостатировали 18 час. при температуре 37°С с 0,25 %-ным раствором желатина в качестве субстрата. Определения проводили при рН 6,0-8,0, используя фосфатные буферы. Об уровне коллагенолитической активности судили по приросту оксипролина, образовавшегося в результате протеолиза желатина и определенного цветной реакцией с парадиметиламинобензальдегидом (Крылова, Ляскова, 1965).

Ферментализ икры проводили при четырех дозировках мегатерина – 20, 30, 40, 50 ПЕ на 100 г икры (из расчета протеолитической активности мегатерина, определенной при рН 6,0 – естественном значении рН икры минтая) – в течение 24 час. при температуре 6 °С. Влияние мегатерина на соединительнотканые белки икры определяли, добавляя фермент в тех же концентрациях и при тех же условиях к ястычным и икорным пленкам, которые получали после удаления соле- и водорастворимых белков икры экстракцией 7,5%-ным раствором хлорида натрия с последующим центрифугированием при 3000 об./мин. в течение 30 мин. Степень протеолиза всех белков и отдельно соединительнотканых белков икры под влиянием мегатерина рассчитывали как отношение азота небелкового, образовавшегося за период инкубирования, к азоту белковому и выражали в процентах (Леванидов и др., 1984).

В качестве вкусовых добавок при изготовлении экспериментальных образцов пасты из некондиционной икры минтая использовали хлористый натрий - 2,5%, сахар - 1%, консервантом являлся бензойнокислый натрий. Исследовали влияние сухих соевых сливок на качественную характеристику продукции. В образцы паст, приготовленные со сливками, вносили их в количестве 2 % к массе ферментированной икры. Контрольный образец паст был изготовлен из неферментированной икры.

Качество образцов оценивали органолептическими, химическими и реологическими методами. Определение количества воды, хлористого натрия и азота летучих оснований в сырье и продукции проводили по общепринятым методам (Лазаревский, 1955). Количество общего азота и небелкового азота определяли с помощью автоматического анализатора Kjeltac 1030. Липкость паст из некондиционной икры минтая измеряли на приборе Rheotech, вязкость – на приборе Rheograph Sol.

Проведенные исследования показали, что протеолитическая активность мегатерина, использованного для ферментирования некондиционной икры минтая, достаточно высока (табл. 1).

Протеолитическая и коллагенолитическая активность ферментов

Препарат	Протеолитическая активность, ПЕ/г,			Коллагенолитическая активность, прирост оксипролина, мкг/г		
	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
Мегатерин Г 10Х	437,2	626,1	458,7	108,8	182,4	130,4
Из внутренностей крабов	–	4,2	–	16,6	–	6,6
Из <i>Cl. histolyticum</i>	–	–	–	81,4	–	64,8

Типичная коллагеназа из *Clostridium histolyticum* и протеазы крабов были взяты для сравнения их коллагенолитических активностей с исследуемым ферментом. В последние годы было установлено, что сериновые протеазы, выделенные из гепатопанкреаса ракообразных, обладают ярко выраженной способностью к деструкции нативного коллагена, но значительно отличаются по свойствам от микробиальных и интерстициальных металлозависимых коллагеназ (Klimova et al., 1990).

Установленная способность мегатерина расщеплять желатин до свободного оксипролина в 6,5 раз выше таковой препарата из крабов при идентичных условиях (pH 6,0) и сравнима с активностью коллагеназы из *Clostridium histolyticum*. Несмотря на то, что оптимальным значением pH как для проявления протеолитической, так и коллагенолитической активности мегатерина является pH 7,0, установлено, что и при pH 6,0 – естественном значении pH икры минтая – активность мегатерина остается достаточно высокой.

Коллагенолитическая активность мегатерина подтверждена работами Л.В. Антиповой, исследовавшей мегатерин этой же опытной партии, что и в данной работе, и показавшей, что в спектрах поглощения обработанного мегатерином коллагена исчезает полоса поглощения 1660 см^{-1} , что обусловлено изменениями молекулярной структуры коллагена (Антипова, Глотова, 2000).

Для установления рациональных условий ферментолиза исследовали протеолиз всех белков икры, а также отдельно – соединительнотканых белков некондиционной икры минтая под влиянием мегатерина, варьируя временем и фермент-субстратным соотношением. С целью ослабления деятельности микрофлоры реакцию проводили при температуре 6°C .

Установлено, что протеолиз под влиянием мегатерина зависит от концентрации фермента (рис. 1), и он гораздо интенсивнее, чем под влиянием протина – комплекса протеаз из пилорических придатков горбуши. Глубина протеолиза сравнима с таковой под влиянием препарата протеаз из гепатопанкреаса крабов (Калиниченко, 1997).

Степень протеолиза соединительнотканых белков под влиянием мегатерина значительно выше, чем глубина гидролиза всех белков икры при той же концентрации фермента и времени взаимодействия (рис. 2). Соединительнотканые белки икры минтая гораздо глубже гидролизуются при идентичных условиях не только препаратом протеаз из внутренностей крабов, но и протинном. Так, через 24 час. ферментолиза степень протеолиза соединительнотканых белков при концентрации ферментов 30 ПЕ/100 г белков составляет под влиянием мегатерина 30,3 %, под влиянием препа-

рата из крабов и протина – 50,0 % и 43,8 % соответственно (Калиниченко, 1997). Это еще раз подтверждает тот факт, что ферменты, проявляющие одинаковую активность в отношении одного субстрата, гидролизуют другой субстрат с различной интенсивностью. Например, основное требование, предъявляемое коллагеназой из *Cl. histolyticum* к строению субстрата, – присутствие остатков пролина или оксипролина в определенном положении относительно чувствительной связи. Замена остатков пролина или оксипролина в молекуле субстрата на остаток саркозина вызывает заметное снижение скорости ферментативной реакции (Мосолов, 1971).

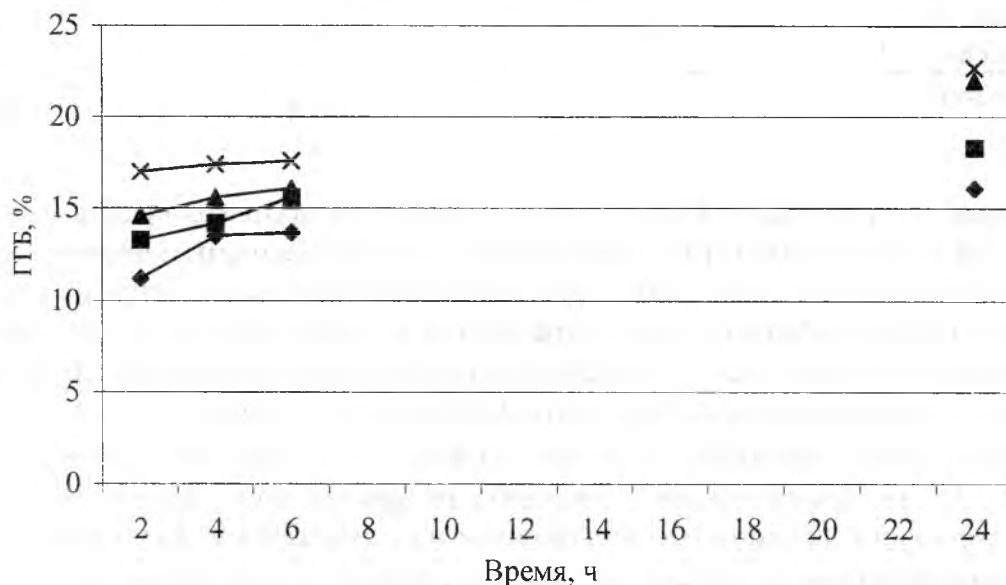


Рис. 1. Глубина гидролиза всех белков некондиционной икры минтая под влиянием мегатерина Г 10Х:

- Условные обозначения:
- ◆ – доза фермента 20 ПЕ/100 г
 - – доза фермента 30 ПЕ/100 г
 - ▲ – доза фермента 40 ПЕ/100 г
 - × – доза фермента 50 ПЕ/100 г

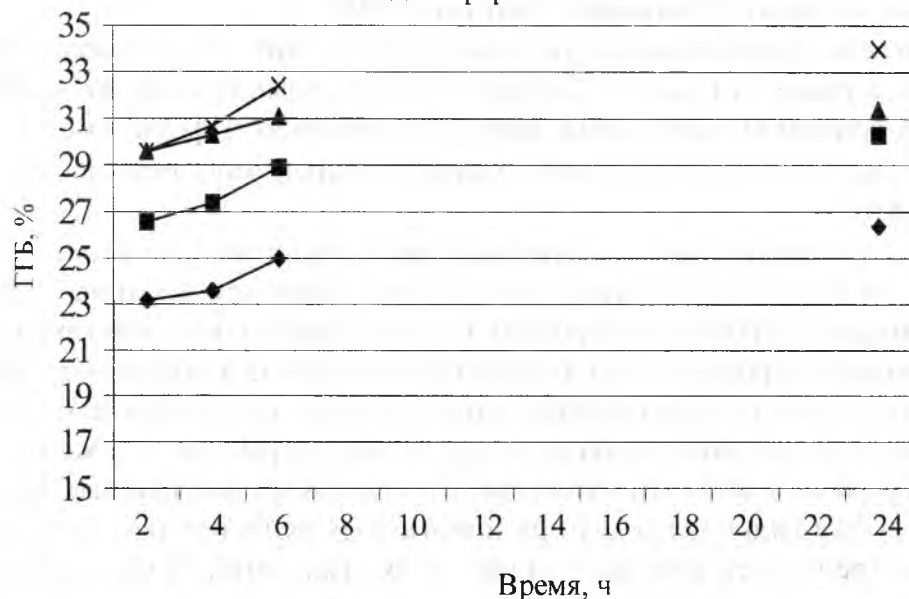


Рис. 2. Глубина гидролиза соединительнотканых белков некондиционной икры минтая под влиянием мегатерина Г 10Х. Обозначения как на рис. 1

Ферментированную икру гомогенизировали, после чего органолептически оценивали консистенцию. Установлено, что при степени протеолиза более 18 % после гомогенизации образуется вязкая нетекучая пастообразная масса. При этом степень протеолиза соединительнотканых белков икры достигает 30 %, что обеспечивает в процессе последующей гомогенизации достаточное измельчение ястычных оболочек и получение однородной, тонко измельченной массы. Необходимая глубина гидролиза белков икры достигается при концентрации мегатерина 30 ПЕ/100 г сырья и продолжительности ферментализации 24 час., при концентрации 40 ПЕ/100 г – через 11,5 час., при концентрации 50 ПЕ/100 г – через 7 час. (см. рис. 1). На этом основании выбрана минимальная концентрация фермента, обеспечивающая за приемлемое время достаточную степень протеолиза сырья.

В результате проведенных исследований разработаны рациональные условия проведения ферментализации: концентрация мегатерина 300 ПЕ/1 кг сырья, продолжительность 24 час. при температуре 6°С.

Из ферментированной при разработанных условиях икры минтая приготовили пасты, качество которых исследовали в процессе хранения. В одном из вариантов использовали соевые белки, богатые аминокислотами, включая незаменимые, хорошо усвояемые организмом. Соевые продукты являются средством для профилактики атеросклероза, сахарного диабета, сердечно-сосудистых нарушений и др. (Федичкина, 2001). Известные функциональные свойства белков сои – их эмульгирующая и влагоудерживающая способности (Богданов, Сафронова, 1993). Таким образом, можно было предполагать, что использование соевых сливок в технологии паст из некондиционной икры минтая обеспечит связывание воды, снизит себестоимость, повысит пищевую ценность продукции.

Органолептическая оценка показала, что соевые сливки улучшают вкусовые качества паст, приготовленных на основе ферментирования сырья мегатерином, за счет снижения горчинки, свойственной икре минтая. Исследование изменений химических характеристик продукции в процессе хранения показали, что под влиянием мегатерина продолжается протеолиз икры, о чем свидетельствует накопление небелковых азотсодержащих соединений и летучих азотистых соединений (табл. 2). Сливки практически не влияют на протеолиз, протекающий в пастах, – количество как $N_{\text{нб}}$, так и $N_{\text{л.о.}}$ в образцах со сливками и без сливок примерно одинаково в одни и те же сроки хранения.

Таблица 2

Изменение химических показателей паст в процессе хранения

Образец	Срок хранения, мес.	Вода, %	Соль, %	$N_{\text{общ}}$, %	$N_{\text{нб}}$, %	$N_{\text{л.о.}}$, %
Из ферментированной икры – контроль	1	71,2	2,7	3,250	649	59,3
	2	71,2	2,9	3,095	661	66,0
	3	70,8	2,7	3,065	730	72,7
	4	70,9	2,6	3,175	788	78,0

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
Из ферментированной икры без добавления сливок	1	71,0	2,9	3,250	1260	86,0
	2	71,1	2,9	3,065	1315	90,0
	3	70,7	2,6	3,245	1440	100,7
	4	70,5	2,7	3,130	1632	115,3
Из ферментированной икры с добавлением сливок	1	70,1	2,9	3,26	1220	76,7
	2	70,1	2,9	3,020	1334	89,3
	3	69,9	2,6	3,005	1448	100,7
	4	69,5	2,6	3,230	1624	114,0

Изменения липкости продукции очень существенны в зависимости от способа приготовления. В неферментированных образцах (контроле) липкость в 3-4 раза ниже липкости ферментированных образцов. Внесение сливок вызывает некоторое увеличение липкости (табл. 3).

Таблица 3

Изменения реологических показателей паст в процессе хранения

Образец	Срок хранения, мес.	Липкость, ПА	Вязкость, Па·с
Из неферментированной икры – контроль	1	191,4	4,3
	2	249,7	7,9
	3	166,5	5,9
	4	152,6	6,8
Из ферментированной икры без добавления сливок	1	873,9	21,2
	2	801,8	13,8
	3	836,4	16,5
	4	1706,2	42,11
Из ферментированной икры с добавлением сливок	1	968,2	21,8
	2	1057,0	18,2
	3	1119,4	24,4
	4	2191,6	52,2

Пастообразные продукты являются сложными дисперсными системами, в которых многокомпонентная дисперсная фаза растворена в дисперсной среде – воде. Силы взаимодействия в такой системе обусловлены как химическими связями, так и количественным соотношением дисперсных фаз, входящих в дисперсионную среду (Рогов и др., 1990). Протеолиз, происходящий под влиянием мегатерина, изменяет белковую составляющую дисперсной фазы: вместо белков образуются продукты их гидролиза, следовательно, дисперсные фазы в сложных дисперсных системах – пастах, приготовленных ферментированием исходного сырья и без него, являются различными, что и обуславливает различия липкости продуктов. Внесение сливок добавляет в дисперсную фазу еще один компонент, что также вызывает изменения липкости.

Динамическая вязкость образцов, приготовленных на основе ферментирования сырья мегатерином, примерно в два раза отличается от вязкости контрольных и составляет более 13 Па × с, что соответствует пастообразной консистенции. В результате гидролиза белков икры минтая под влиянием мегатерина образуются продукты протеолиза, присутствие которых в пасте увеличивает вязкость продукции, обеспечивая образование пастообразной структуры.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена возможность получения паст из ферментированных мегатерином ястыков некондиционной икры минтая без внесения в структурообразователи, обладающих вязкостью, соответствующей пастообразной консистенции. Для получения пастообразной структуры продукта степень протеолиза при ферментации должна составлять более 18 %. Разработаны рациональные условия ферментации, обеспечивающие требуемую степень протеолиза: доза фермента 300 ПЕ/1 кг ястыков, время ферментации – 24 час. при температуре 6°С. Сухие соевые сливки улучшают органолептические показатели качества икорных паст, полученных на основе ферментации сырья мегатерином, не влияют на протеолиз, незначительно увеличивают динамическую вязкость, снижают себестоимость, увеличивают выход готовой продукции.

ЛИТЕРАТУРА

- Антипова Л.В., Глотова И.А.** Получение коллагеновых субстанций на основе ферментативной обработки вторичного сырья мясной промышленности // Изв. вузов. Пищевая технология. - 2000. - № 5-6. - С. 17-21.
- Богданов В.Д., Сафронова Т.М.** Структурообразователи и рыбные композиции. - М.: ВНИРО, 1993. - С. 172.
- Каверзнева Е.Д.** Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеиназ. // Прикл. биохим. и микробиол. - 1971. - Т. 7. - Вып. 2. - С. 225-228.
- Калиниченко Т.П.** Протеолиз некондиционной икры горбуши и минтая под влиянием ферментных препаратов // Изв. ТИНРО. - 1997. - Т. 120. - С. 162-168.
- Крылова Н.И., Ляковская Ю.Н.** Физико-химические методы исследования продуктов животного происхождения. - М.: Пищепромиздат, 1965. - 281 с.
- Лазаревский А.А.** Технохимический контроль в рыбообрабатывающей промышленности. - М.: Пищепромиздат, 1955. - 518 с.
- Мосолов В.В.** Протеолитические ферменты. - М.: Наука, 1971. - 414 с.
- Пат. № 5518742 США МКИ А 23 L 1/317, А 23 J 3/04, А 23 J 3/10, А 23 J 3/34 Enzyme preparation for producing bound-formed food / Soeda T., Yamazaki K., Sakaguchi S., Ishii C., Hondou K.; Ajinomoto Co., Inc. - Заяв. 17.05.95. - Оpubл. 21.05.96.
- Рогов И.А., Горбатов А.В., Свинцов В.Я.** Дисперсные системы мясных и молочных продуктов. - М.: Агропромиздат, 1990. - 320 с.
- Федичкина Н.В.** Новые ингредиенты и их роль в современном производстве пищевой рыбной продукции // Мат-лы III Междунар. конф. «Повышение кач-ва рыб. продукции – стратегия развития рыбоперераб. в XXI веке». - Калининград, 2001. - С. 77-82.
- Eisgruber H., Brunner B., Stolle A.** Asiatische SoBen and Pasten aus Krustentieren und Fishen – lebensmittel hygienische Aspekte //Wien. Tierarztl. Monatsschr. - 1995. - Vol. 82, N 3. - P. 69-74.
- Klimova O.A., Borukhov S.I., Solovyeva N.I. et al.** The isolation and properties of collagenolytic proteases from crab hepatopancreas // Biochem. Biophys. Res. Com. - 1990. - Vol. 166, N 3. - P. 1411-1420.