

*На правах рукописи*



**Волчок  
Анастасия Александровна**

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

03.01.06 - Биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва 2016

Работа выполнена в лаборатории Биотехнологии ферментов Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

**Научный руководитель:** **Синицын Аркадий Пантелеймонович**  
доктор химических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Штильман Михаил Исаакович**  
доктор химических наук, профессор, руководитель Учебно-научного центра магистерской подготовки «Биоматериалы» ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»

**Абрамова Ирина Михайловна**  
доктор технических наук, временно исполняющая обязанности заместителя директора по научной работе, заведующая отделом технологии и контроля производства спиртных напитков ВНИИПБТ – филиала ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, и на сайте Химического факультета МГУ <http://www.chem.msu.ru>.

Автореферат диссертации размещён на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: [vak.ed.gov.ru](http://vak.ed.gov.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года.

Учёный секретарь  
Диссертационного совета Д 501.001.59,  
кандидат химических наук

 Сакодынская И.К.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

Предварительная ферментативная обработка плодовой мякоти является одним из наиболее эффективных методов интенсификации ряда технологических процессов (прессование, осветление, фильтрация), позволяющих получить из неё больше сока, насыщенного вкусовыми и питательными веществами. Такая обработка основана на деструкции ферментными препаратами (ФП) полисахаридов в составе растительной клеточной стенки – целлюлозы, гемицеллюлоз, пектина.

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

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

**Целью** исследования являлось изучение влияния новых ФП на степень разрушения растительной клеточной стенки, на процессы получения плодового сула из различного по составу сырья и на качество конечных продуктов при изготовлении виноградных и фруктовых вин, а также выявление потенциала ферментативной обработки при извлечении ценных веществ из отходов винодельческого производства.

### **Задачи исследования.**

- Получить ФП на основе штаммов-продуцентов, созданных в лаборатории Биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН и предназначенных для переработки плодово-ягодного сырья.
- Охарактеризовать полученные ФП с точки зрения соотношения в них ферментативных активностей и их компонентного состава.

- Выявить наиболее эффективные ФП для обработки мезги различного растительного сырья.
- Подобрать оптимальные дозировки ФП, а также режимы ферментативной обработки для каждого из использованных типов мезги.
- Изготовить ряд виноградных и фруктовых виноматериалов, описать их характеристики.
- Подтвердить целесообразность применения новых ФП при изготовлении вин посредством выявления увеличения выхода сока из мезги и сохранения или улучшения физико-химических показателей полупродуктов (сусла) и готовых вин.
- Получить с помощью новых ФП гидролизаты сброженных виноградных выжимок (отходов винодельческого производства) и установить перспективы получения на их основе фенольных экстрактов.
- Установить показатели безопасности и исследовать алергизирующие свойства наиболее эффективного из полученных новых ФП на животных моделях, установить концентрацию микотоксинов в ФП и в получаемых виноматериалах.

**Научная новизна работы.** Впервые проведена оптимизация состава сред культивирования рекомбинантных штаммов *Penicillium verruculosum* РВ4 и РВ7 с целью эффективного продуцирования пектолитических и целлюлолитических ферментов с сокращением сырьевых затрат. Получены сухие формы ФП, позволяющих добиться эффективного разрушения различных групп полисахаридов растительной клеточной стенки, что открывает перспективы их использования в соковой и винодельческой промышленности.

Осуществлена обработка различных видов плодово-ягодного сырья новыми мультиферментными комплексами карбогидраз, разработаны технологии получения фруктовых и виноградных вин, включающие стадию ферментативной предобработки мезги. Выявлены возможности переработки отходов винодельческого производства с помощью новых ФП.

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

Разработанные технологические схемы получения вин, включающие ферментативную обработку растительного сырья новыми ФП, позволяют

ускорить технологические процессы, получить сусло с улучшенными реологическими свойствами, увеличить выход из растительного сырья наиболее ценных, самотечных фракций сусла.

В ходе работы проведены эксперименты, направленные на выявление токсикологических и алергизирующих свойств наиболее эффективного для широкого спектра сырья нового ФП, представляющего собой мультиферментный комплекс карбогидраз, и подтверждающие безопасность его использования.

**Связь работы с государственными программами.** Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно технологического комплекса России на 2014-2020 годы" (идентификационный номер проекта RFMEFI60714X0050).

**Личный вклад диссертанта.** Автор лично проводил анализ литературных данных, участвовал в постановке задач и планировании экспериментов. Все результаты, их интерпретация и выводы получены автором на основе лично проведенных экспериментов или непосредственно при его участии. В подготовке публикаций и докладов на научных конференциях по теме диссертационной работы автор принимал личное участие.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты работы были освещены на следующих научных конференциях и конкурсах: Международная научная конференция, посвященная 150-летию академика Вильямса, РГАУ ТСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 2013 г.; Весенний финал «У.М.Н.И.К.» МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 2013 г.; VII Международный научно-практический симпозиум «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов», ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии, Москва, 2014 г.

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы изложены в 9 публикациях, в том числе: в 4 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК РФ; в 1 статье в журнале, входящем в библиографическую базу данных SciVerse Scopus; в 3 тезисах и в 1 статье в сборнике материалов конференции.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, разделов, в которых описаны материалы и методы, а также результаты и их обсуждение, заключения, списка цитируемой литературы (169 ссылок), приложения. Работа изложена на 138 страницах, включает 43 рисунка, 25 таблиц и 1 приложение.

**Сокращения, принятые в тексте.** ФП – ферментный препарат; МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная

хроматография; КЖ – культуральная жидкость; ИФА – иммуноферментный анализ; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; ПЕЛ – пектинлиаза; ЦБГ – целлобиогидролаза; ЭГ – эндо-1,4-β-глюканаза; БГЛ – β-глюкозидаза; ВС – восстанавливающие сахара.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** сформулированы цель и задачи исследования, обозначены актуальность, научная новизна и научно-практическая значимость исследований, приведены сведения об основных методах исследований и степени достоверности результатов, представлены положения диссертации, выносимые на защиту.

**Обзор литературы** охватывает основные технологические аспекты производства фруктовых и виноградных вин, а также характеризует наиболее распространенные проблемы, возникающие при переработке различных видов плодов и ягод, и методы их решения. Отмечено, что в качестве одного из эффективных и широко используемых способов предобработки растительного сырья является воздействие различных ферментов. Описан опыт использования различных ФП в винодельческой отрасли и преимущества обработки сырья, проводимой с их помощью. Обсуждены возможности применения ФП при переработке отходов плодового сырья и винограда.

**Материалы и методы.** В этой главе описаны материалы и методы исследования. Для получения новых ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7 использовали рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* РВ4 и РВ7, созданные путем котрансформации целевыми плазмидами с генами пектинлиазы *pelA* (*P. canescens*) и β-глюкозидазы *bgIII* (*A. niger*) с трансформирующей плазмидой рСТА 10 ауксотрофного штамма-реципиента *P. verruculosum*. В качестве контрольного использовали штамм-реципиент ВІ *niaD*(-). При обработке виноградной мезги применяли также коммерческие ФП серии «Тренолин ДФ» (Döhler, Германия). Плодовое сырье для исследований было предоставлено РГАУ МСХА им. Тимирязева (рябина, желтая слива, черная смородина); виноград технологических сортов («Цимлянский Черный», «Каберне Совиньон», «Ркацители», «Изабелла»), сброженные выжимки красных сортов винограда («Цвейильт», «Жупский», «Амур», «Мерло») – ОАО «Цимлянские вина». Половозрелые самцы крыс линий Wistar и Norway Brown, используемые в экспериментах, были предоставлены виварием ФИЦ Биотехнологии РАН.

Культивирование штаммов-продуцентов проводили в 10-литровом ферментере при рН 4,5 и 32 °С в течение 144 часов, используя ферментационную среду с пониженным содержанием микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) с целью уменьшения себестоимости ФП. После окончания ферментации получали сухие ФП путем лиофильного высушивания культуральной жидкости (КЖ). В

новых ФП определяли содержание белка по методу Лоури, а также ряд ферментативных активностей. Компонентный состав ФП определяли с помощью методов анионообменной и гидрофобной хроматографии.

В ходе испытаний проводили ферментативный гидролиз предварительно измельченных плодов и ягод. Для каждого вида сырья выбирали ФП, обеспечивающий наибольшее насыщение суслу сахарами и наиболее интенсивный выход суслу из мезги, оптимальные температурный и временной режимы обработки, дозировку вносимого ФП. На основе полученных данных составляли технологические схемы получения фруктовых и виноградных вин, изготавливали вина согласно составленным схемам, включающим обработку мезги ФП. Контролируемыми показателями качества суслу при получении вин были выход суслу из мезги, вязкость, содержание взвесей. В готовых виноматериалах определяли ряд физико-химических параметров, а также их органолептические свойства. Целесообразность применения лабораторных ФП для переработки отходов винодельческого производства оценивали, измеряя в гидролизатах виноградных выжимок содержание восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы, а также насыщенность полученных экстрактов веществами фенольной природы с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В лабораторном ФП, показавшем высокую эффективность обработки мезги большинства из используемых растительных субстратов, а также в виноматериале, полученном с его помощью, определяли содержание микотоксинов методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью наборов RIDASCREEN «Aflatoxin Total» и «Ochratoxin A 30/15» (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Острую токсичность этого ФП и алергизирующие свойства в реакции иммуноферментных комплексов и при внутрижелудочном введении оценивали, используя половозрелых самцов крыс линий Wistar и Norway Brown.

**Результаты и обсуждение** представлены в главах 4-8 диссертационной работы.

### ***1. Состав и свойства ферментных препаратов***

На начальных этапах исследований с помощью рекомбинантных штаммов гриба *P. verruculosum* PB4 и PB7 получали новые ФП VI 7.4 и VI 7.7, содержащие ферменты, обеспечивающие разрушение полисахаридов плодов. Штаммы *P. verruculosum* PB4 и PB7 были выбраны для исследования, так как состав получаемых на их основе ФП отвечал требованиям эффективной биоконверсии компонентов растительной стенки плодов, основными составляющими которой являются целлюлоза, гемицеллюлозы и пектин. В качестве контроля использовали

ФП VI *niaD(-)*, полученный с помощью штамма-реципиента, секретирующего комплекс целлюлаз. Для анализа эффективности новых ФП при обработке винограда использовали также коммерческие ФП серии «Тренолин ДФ», предназначенные для применения в винодельческой отрасли.

Штаммы *P. verruculosum* PB4 и PB7 культивировали на средах с пониженным содержанием МКЦ, корректируя тем самым их производственную себестоимость. Определение состава и ферментативных активностей новых ФП по отношению к различным субстратам позволило прогнозировать возможности их использования для обработки растительного сырья разного состава, а также сравнить эти ФП с полученными ранее аналогами на среде с более высоким содержанием МКЦ и используемыми в работе коммерческими ФП.

Содержание белка в ФП, а также их удельные ферментативные активности по отношению к различным субстратам представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика используемых в работе лабораторных и коммерческих ФП.

ФП	Содержание белка, мг/г (мл) ФП	Удельная активность, ед/мг белка					
		Ксиланазная	$\beta$ -глюкозидазная	Целлюлазная (КМЦ)	Целлюлазная (МКЦ)	Полигалактуроназная	Пектинлиазная
VI 7.4	885 $\pm$ 120	3,18 $\pm$ 0,09	6,7 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,3	0,20 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,02	3,55 $\pm$ 0,22
VI 7.7	608 $\pm$ 85	7,3 $\pm$ 0,5	0,98 $\pm$ 0,08	5,1 $\pm$ 0,4	0,30 $\pm$ 0,02	1,3 $\pm$ 0,1	2,30 $\pm$ 0,17
VI <i>niaD(-)</i> , контроль	960 $\pm$ 116	10,9 $\pm$ 0,7	1,01 $\pm$ 0,08	5,3 $\pm$ 0,4	0,29 $\pm$ 0,02	-	-
Маш (2039)*	33,0 $\pm$ 5	1,76 $\pm$ 0,11	0,08 $\pm$ 0,01	1,2 $\pm$ 0,1	0,05 $\pm$ 0,01	11,1 $\pm$ 1,2	0,30 $\pm$ 0,03
Букет (2040)*	74,0 $\pm$ 9	4,1 $\pm$ 0,3	0,75 $\pm$ 0,08	6,4 $\pm$ 0,5	0,11 $\pm$ 0,01	4,4 $\pm$ 0,3	0,05 $\pm$ 0,01
Фильтро (2041)*	23,0 $\pm$ 3,5	4,02 $\pm$ 0,28	0,82 $\pm$ 0,09	3,2 $\pm$ 0,3	0,06 $\pm$ 0,01	5,5 $\pm$ 0,3	0,09 $\pm$ 0,01
Термо (2042)*	43,0 $\pm$ 4,3	1,56 $\pm$ 0,07	-	2,3 $\pm$ 0,3	0,09 $\pm$ 0,01	7,3 $\pm$ 0,5	0,34 $\pm$ 0,03
Опти (2043)*	56,0 $\pm$ 8,5	0,90 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,09	-	62,2 $\pm$ 4,9	0,66 $\pm$ 0,05
Супер (2044)*	4,0 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,1	0,07 $\pm$ 0,01	3,6 $\pm$ 0,2	0,07 $\pm$ 0,01	36,7 $\pm$ 2,6	0,90 $\pm$ 0,05
Колор (2045)*	40,0 $\pm$ 6	0,51 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,06	0,02 $\pm$ 0,01	31,2 $\pm$ 2,9	0,72 $\pm$ 0,06
Руж (2046)*	52,0 $\pm$ 7,8	5,2 $\pm$ 0,4	0,45 $\pm$ 0,05	2,8 $\pm$ 0,3	0,06 $\pm$ 0,01	4,4 $\pm$ 0,3	0,11 $\pm$ 0,01

\* - коммерческие ФП серии «Тренолин ДФ».

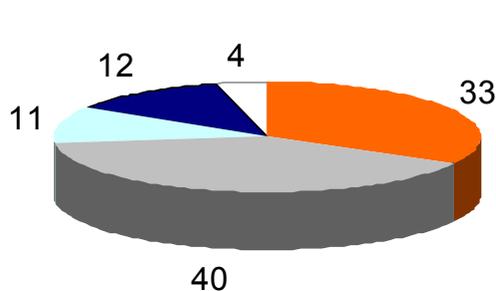
ФП VI 7.4 и VI 7.7 характеризуются относительно высокими гетерологичными  $\beta$ -глюкозидазной и пектинлиазной активностями. В ФП VI 7.4 эти активности наиболее высоки, тогда как ксиланазная и целлюлазные активности в ФП VI 7.7 выше по сравнению с ФП VI 7.4. Отметим, что удельная ксиланазная активность в контрольном ФП VI *niaD*(-), полученном с помощью штамма-реципиента, выше, чем в ФП, полученных с помощью рекомбинантных штаммов.

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

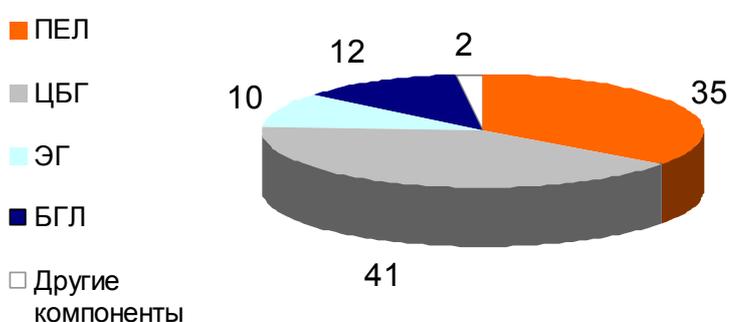
Исследуемые лабораторные и коммерческие ФП схожи наличием в них пектиназных, целлюлазных и гемицеллюлазных активностей, однако соотношение их различно. При этом коммерческие ФП предназначены для освобождения из кожицы ягод винограда красящих и дубильных веществ. Поэтому можно предположить, что лабораторные ФП в перспективе способны решать те же задачи с большей эффективностью за счет более сбалансированного состава.

Компонентный состав ФП на основе штаммов *P. verruculosum* PV4 (VI 6.4 и VI 7.4) и PV7 (VI 6.7 и VI 7.7), полученных на ферментационной среде с содержанием МКЦ 2 % и 4 % соответственно, представлен на рисунке 1.

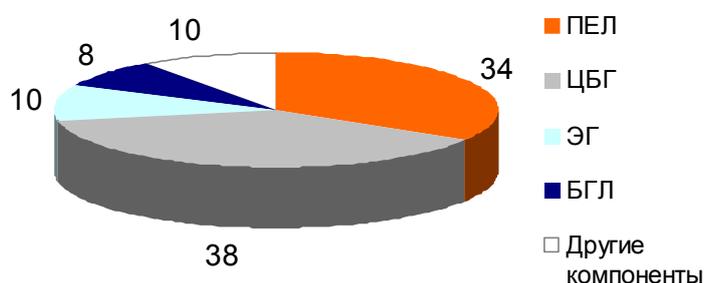
ФП VI 6.4 (4 % МКЦ)



ФП VI 7.4 (2 % МКЦ)



ФП VI 6.7 (4 % МКЦ)



ФП VI 7.7 (2 % МКЦ)

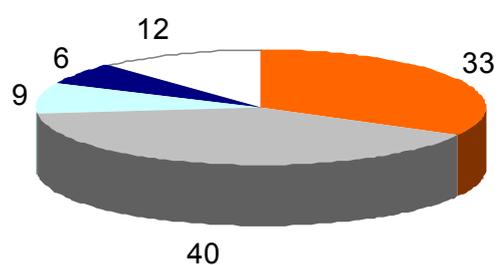


Рисунок 1 - Компонентный состав (%) ФП, полученных на основе штаммов *P. verruculosum* РВ4 и РВ7, культивированных на средах с различным содержанием МКЦ.

Как видно из рисунка 1, снижение содержания МКЦ в ферментационной среде с 4 до 2 % не оказало негативного влияния на состав получаемых ФП. Так, содержание пектинлиазы в ФП VI 7.4 и VI 7.7, полученных с использованием среды с пониженным содержанием МКЦ, изменилось не более чем на 2 % в сравнении с ФП на основе штаммов *P. verruculosum* РВ4 и РВ7, культивируемых на среде с 4 % МКЦ.

## 2. Ферментативный гидролиз различных видов растительного сырья

В предварительных экспериментах по переработке растительного сырья была выявлена специфичность лабораторных ФП по отношению к различным видам плодов, сравнение их гидролитической способности с коммерческими аналогами (обработка винограда), применяемыми в традиционной виноделии, а также были определены оптимальные условия ферментативной обработки, которые позволили бы получить продукт с высокими органолептическими показателями.

Обработку плодового сырья и винограда с помощью ФП VI 7.4, VI 7.7 и VI niaD(-) проводили в течение 48 часов при перемешивании (900 об/мин) и температуре 50 °С (20 °С для винограда). ФП использовали в дозировках (по белку): 0,02; 0,03 и 0,05 % от массы субстрата. Объем одного образца реакционной смеси составлял 20 мл и включал: плодовую мезгу, 0,1 М ацетатный буферный раствор (рН 5,0), дистиллированную воду (для плодовых субстратов), ФП, антибиотик. Обработку винограда осуществляли также с помощью коммерческих ФП.

В полученных гидролизатах определяли содержание ВС, глюкозы и выход сока через складчатый фильтр, на основании этих данных судили об эффективности действия ФП на каждый вид сырья, используемого в работе.

Проведение обработки ФП рябины, черной смородины, желтой сливы и винограда ФП показало, что с учетом выхода сока и содержания в нем сахаров оптимальным для обработки рябины и винограда является ФП ВІ 7.7, для обработки сливы и черной смородины – ФП ВІ 7.4. Наибольшая разница в выходе самотечной фракции суслу между опытными и контрольными образцами была достигнута при обработке сливы ФП ВІ 7.4 – выход самотечной фракции возрос более чем в 10 раз в сравнении с пробой без ФП. Это обусловлено тем, что ФП ВІ 7.4 характеризовался выраженной пектинлиазной активностью, что позволило добиться видимого разжижения богатых пектиновыми веществами черной смородины и сливы в короткий период времени. ФП ВІ 7.7 содержит комплекс целлюлаз и гемицеллюлаз, а также пектинлиазу, поэтому состав его ферментного комплекса адаптирован к составу полисахаридных комплексов рябины и винограда. Отметим, что используемый в качестве контроля ФП ВІ piaD(-), полученный с помощью штамма-реципиента, не содержащий пектинлиазы и имеющий в своём составе только целлюлазы и гемицеллюлазы, уступал по показателям эффективности действия ФП ВІ 7.4 и ВІ 7.7 для всех видов сырья.

Эффективность применения лабораторного ФП ВІ 7.7 превосходит таковую для используемых в работе коммерческих ФП – в среднем на 12 % по выходу суслу из виноградной мезги (менее значительно – по накоплению в сусле сахаров). Это связано, вероятно, с более сбалансированным с точки зрения разрушения полисахаридов сырья компонентным составом ФП ВІ 7.7 относительно коммерческих аналогов.

Оптимальная дозировка лабораторных ФП по белку с точки зрения достижения максимального содержания ВС и глюкозы в гидролизатах – 0,02 и 0,03 % от массы сырья. Оптимальное время экспозиции используемой плодовой и ягодной мезги в присутствии ФП – 24 часа, время обработки виноградного суслу перед началом брожения целесообразно лимитировать технологическими особенностями производства столовых вин. Температурные режимы для проведения обработки ФП: для рябины и черной смородины 30 °С, для желтой сливы – 50 °С, для винограда температурный режим обусловлен принятыми технологическими особенностями производства (в данном случае – 20 °С).

### ***3. Изготовление фруктовых и виноградных вин с использованием ферментных препаратов***

По технологическим схемам, включающим обработку мезги ФП, изготавливали: сухое фруктовое вино и натуральные некрепленые сладкие фруктовые вина; красный полусухой виноматериал, розовое и белое сухие вина, розовое полусладкое вино. В качестве контрольных образцов получали вина по

идентичным схемам, но без внесения ФП и с увеличенным временным интервалом мацерации сусла с мезгой.

В ходе исследований осуществляли контроль выхода самотечных и прессовых фракций сусла из образцов (таблица 2), измеряли вязкость сусла и содержание в нем взвесей. Образцы готовых виноматериалов подвергали физико-химическому анализу (таблица 3), а также органолептической оценке. По результатам экспериментов делали выводы о целесообразности использования полученных нами новых ФП.

Таблица 2 - Влияние ФП на выход самотечных и прессовых фракций сусла из измельченных плодовых субстратов по завершении стадии мацерации в пересчете на 1 т мезги.

ФП, используемые в процессе настаивания сусла на мезге	Объем полученных фракций сусла		
	Выход сока-самотека из 1 т мезги, дм <sup>3</sup>	Выход прессовых фракций из 1 т мезги, дм <sup>3</sup>	Общий выход сусла из 1 т мезги, дм <sup>3</sup>
<b>Рябина «Красавица»</b>			
ВІ 7.7	358±8,2	414±8,3	770±11
Без ФП	229±5,7	520±11	750±13
<b>Слива «Желтая Хопты»</b>			
ВІ 7.4	710±10,6	147,7±2,9	858,6±14,6
Без ФП	242,7±5,5	316,4±6,3	559±8,4
<b>Черная смородина</b>			
ВІ 7.4	618,2±9,5	242,7±5,5	861±9,6
Без ФП	545,5±8,2	275±6,3	821±8,5
<b>Виноград «Цимлянский Черный»</b>			
ВІ 7.7	574,7±8,3	172±3,4	746,6±8,4
Без ФП	340±6,8	233,3±5,1	573,3±8,5
<b>Виноград «Каберне Совиньон»</b>			
ВІ 7.7	595,3±7,9	198,8±3,9	794,1±8,7
Без ФП	429±6	297,5±6,1	726,5±8,7
<b>Виноград «Изабелла»</b>			
ВІ 7.7	610±8,5	192±3,8	800±8,8
Без ФП	457,5±6,8	292,5±5,2	750±9
<b>Виноград «Ркацители»</b>			
ВІ 7.7	572,7±8,6	181±3,6	754±9
Без ФП	453±6,8	278±5,5	731±8,7

Очевидно, что обработка мезги ФП приводила к увеличению выхода сусла. Так, использование ФП ВІ 7.7 и 7.4 в технологии фруктовых вин увеличивала общий выход сусла на 10-50 %, при этом выход сусла из ферментированной мезги для всех видов плодового сырья составлял 75-85 % от массы мезги, поступившей на прессование.

Выход сусла из виноградной мезги с применением ФП VI 7.7 также заметно возрастал. При ферментативной обработке виноградной мезги увеличивалась доля самотечной фракции в общем объеме сусла. Это особенно важно, если модернизация технологического процесса направлена на корректировку качества получаемого полупродукта. Самотечное сусло отличается от прессовых фракций меньшим содержанием взвесей и волокон, составляющих осадочную массу и препятствующих в дальнейшем фильтрации и осветлению сусла.

С применением ФП VI 7.4 и VI 7.7 вязкость сусла самотечных и прессовых фракций сока плодового сырья и массовая доля взвесей в них снижались относительно контрольных образцов. В случае виноградного сусла различие в показателях опытных и контрольных образцов было несколько сглажено, видимо, из-за особенности полисахаридного состава сырья (меньшего содержания пектиновых веществ).

В таблице 3 представлены основные физико-химические параметры сухих фруктового и виноградных вин, полученных с помощью применения ФП. Было зафиксировано снижение содержания летучих кислот в образцах сухих вин, изготовленных с применением ФП VI 7.4 и VI 7.7. Полученные данные подтверждают наблюдаемое отсутствие снижения насыщенности и густоты цвета продукта с сокращением стадии мацерации в присутствии ФП. Кроме того, результаты определения общего содержания в образцах вин фенолов и антоцианов говорят об отсутствии обеднённости химического состава виноматериалов, прошедших сокращенный этап настаивания сусла на мезге. Подобные зависимости наблюдали и применительно к другим полученным во время работы виноматериалам.

Результаты, полученные в ходе изготовления виноматериалов и физико-химической оценки образцов вин, безусловно, свидетельствуют о целесообразности применения полученных нами новых ФП в винодельческой промышленности. Их использование способствует увеличению выхода сусла из плодовой и виноградной мезги, интенсификации процессов осветления и фильтрации за счет снижения вязкости сусла и содержания в нем взвесей, а также получению виноматериалов, обогащенных красящими веществами, и с меньшим содержанием летучих компонентов, отвечающих за ноты окисленности в аромате готовых вин.

Таблица 3 - Физико-химические показатели сухих фруктового и виноградных вин.

Показатель	Сухие фруктовое и виноградные вина					
	Рябина «Красавица»		Виноград «Изабелла»		Виноград «Ркацители»	
	ВІ 7.7	Без ФП	ВІ 7.7	Без ФП	ВІ 7.7	Без ФП
Объемная доля этилового спирта, % об.	13±0,5	13±0,5	11±0,5	11±0,3	10±0,5	10±0,5
Массовая концентрация приведенного экстракта, г/л	13,5±0,8	13,5±0,9	18±0,8	18±1,0	18±0,8	17±0,7
Массовая концентрация сахаров, г/л	-	-	0,42±0,02	0,41±0,02	0,44±0,02	0,40±0,02
Массовая концентрация титруемых кислот, г/л	5,3±0,3	5,4±0,4	7,3±0,3	7,3±0,3	7,2±0,4	7,2±0,4
Массовая концентрация летучих кислот, г/л	0,51±0,04	0,55±0,02	0,45±0,01	0,53±0,02	0,31±0,01	0,42±0,01
Интенсивность цвета	2,1±0,1	2,1±0,1	1,14±0,04	1,11±0,04	0,22±0,01	0,11±0,005
Оттенок	0,80±0,04	0,72±0,04	0,81±0,04	0,72±0,04	2,3±0,1	2,1±0,1
Относительная яркость, %	36±1,8	38±1,8	46±2,3	48±2,3	91±4,6	92±4,5
Общее содержание фенолов, г/л	0,91±0,03	0,91±0,03	1,16±0,04	1,33±0,05	0,73±0,03	0,71±0,03
Массовая концентрация красящих веществ (антоцианов), г/л	0,51±0,02	0,51±0,02	0,65±0,03	0,76±0,03	0,42±0,02	0,42±0,02
Общее содержание SO <sub>2</sub> , мг/л	117±8,9	118±8,8	180±11	180±10	181±9,9	181±9,5
Содержание свободного SO <sub>2</sub> , мг/л	70±7	70±7	116±9	116±8	115±7,5	115±7,7

Органолептическая оценка сухого вина из рябины и сухих виноградных вин из сортов «Изабелла» и «Ркацители» подразумевала определение таких параметров, как фруктовые и сортовые тона в аромате, а также основные параметры вкуса. На рисунках 2 и 3 приведены результаты органолептических тестов данных образцов вин.

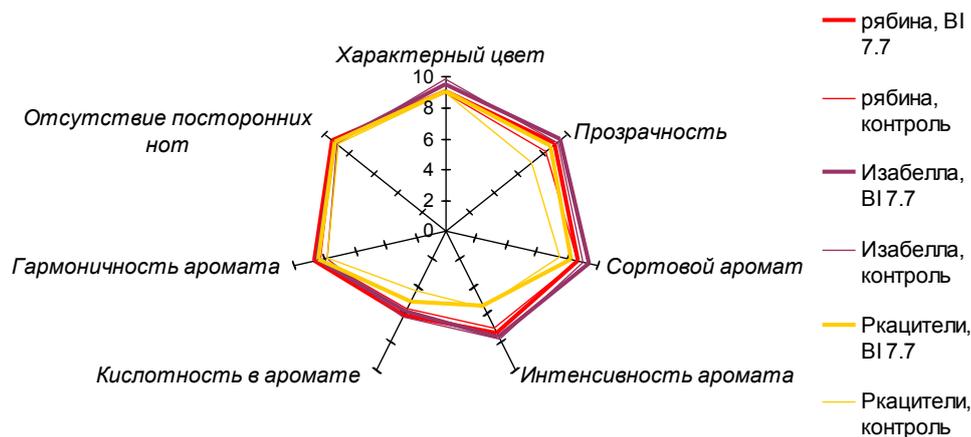


Рисунок 2 -  
Органолептическая  
диаграмма внешнего  
вида и  
ароматических  
характеристик  
образцов сухих  
фруктового и  
виноградных вин.

Отметим, что вино из сорта «Ркацители», полученное с помощью ФП ВП 7.7, отличалось значительно большей прозрачностью. Если говорить о вкусовых характеристиках вин, то значимой зависимости средних значений атрибутов вкуса от применения в технологии ферментативной обработки суслу не наблюдали.

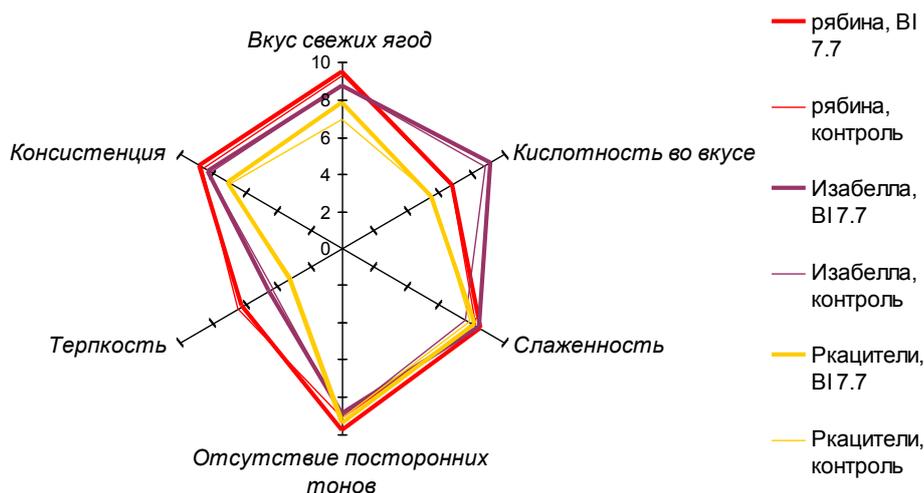


Рисунок 3 -  
Органолептическая  
диаграмма вкусовых  
качеств образцов  
сухих фруктового и  
виноградных вин.

Фруктовые вина, полученные в результате применения ФП, отличались меньшим количеством взвесей и меньшей мутностью. Этот эффект особенно ярко был выражен на примере вина из желтой сливы.

Проведенные органолептические тесты подтверждают, что применение новых ФП в технологиях виноградного виноделия и в производстве фруктовых вин, позволяет получать гармоничные вина с яркими фруктовыми нотами в аромате и положительно влияет на внешний вид продукта.

#### **4. Состав экстрактов сброженных виноградных выжимок, полученных с помощью ферментных препаратов**

Ферментативный гидролиз виноградных выжимок проводили для определения возможностей использования новых ФП при получении функциональных продуктов из отходов традиционного винодельческого производства. В экстрактах виноградных выжимок определяли содержание

глюкозы и ВС, а также наличие ряда фенольных соединений методом ВЭЖХ. Эффективность использования лабораторных ФП сравнивали с таковой для коммерческих препаратов серии «Тренолин ДФ».

Оптимальная длительность процесса ферментативной обработки составила 24 часа; во временном промежутке от 3-х до 24-х часов наблюдали увеличение концентрации ВС и глюкозы в экстрактах в среднем на 30 %; от 24-х часов до 48-ми – на 1-2 %. Оптимальная дозировка ФП – 5 мг белка/г с.в. сырья, дальнейшее увеличение дозировки вносимого ФП не приводило к видимым изменениям в содержании ВС в экстрактах. На рисунке 4 приведено содержание ВС и глюкозы в образцах гидролизатов выжимок из винограда сорта «Цвейилт».

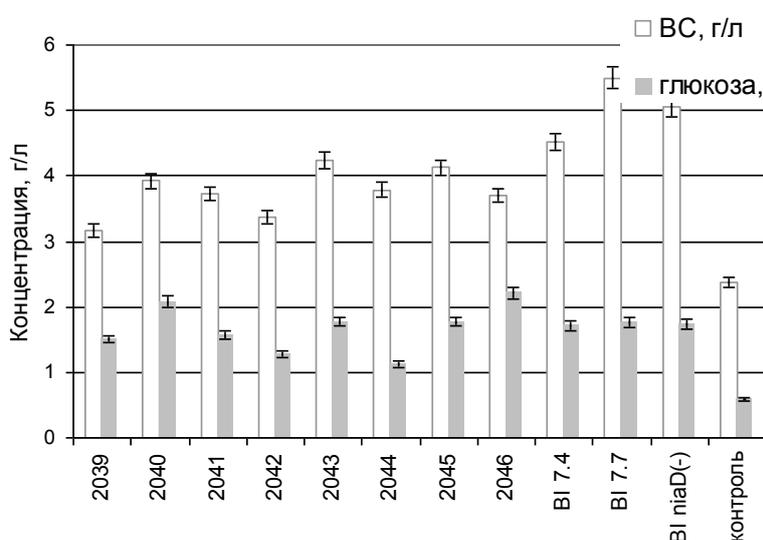


Рисунок 4 - Содержание ВС и глюкозы в гидролизатах виноградных выжимок сорта «Цвейилт» через 24 часа ферментативной обработки при 50 °С и дозировке ФП 5 мг/г с.в. сырья.

Наиболее эффективным для переработки виноградных выжимок оказался препарат BI 7.7. Среди серии коммерческих ФП «Тренолин ДФ» наиболее эффективными можно считать препараты «Опти» (2043) и «Колор» (2045). Эти ФП превосходили показатели лабораторных ФП только по накоплению в субстрате сахаров для выжимок винограда сорта «Мерло». В остальных случаях лабораторный препарат BI 7.7 не уступал или превосходил показатели контрольных коммерческих аналогов, используемых в работе.

Наибольший выход фенольных веществ в случае использования коммерческих ФП серии «Тренолин ДФ» наблюдали в образцах, обработанных ФП «Опти» (2043), «Колор» (2045) и «Руж» (2046). Состав экстрактов, полученных с использованием этих и лабораторных ФП, представлен на рисунке 6, в таблице 4 представлены вещества фенольной природы, используемые в качестве стандартов при хроматографическом анализе состава экстрактов виноградных выжимок.

Номер стандарта	Вещество
1	галловая кислота
2	пирокатехин
3	3,4-дигидроксибензойная кислота
4	4-гидроксибензойная кислота
5	2-гидроксифенилуксусная кислота
6	ванилиновая кислота
7	кофеиновая кислота
8	сиреневая кислота

Таблица 4 - Вещества фенольной природы, включенные в смесь стандартов.

После обработки сброженных виноградных выжимок ФП наблюдали повышение содержания галловой кислоты в сравнении с контрольным образцом (без фермента). В случае обработки ФП выжимок винограда сортов «Цвейильт» (рисунок 5), «Жупский» и «Амур» экстракты обогащались 2-гидроксифенилуксусной и ванилиновой кислотами, что говорит о высокой мацерирующей способности новых ФП.

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

Таким образом, обработка виноградных выжимок лабораторными ФП дает возможность получить экстракты, обогащенные сахарами и галловой кислотой, являющейся антиоксидантом и используемой при синтезе ряда красителей, а также в качестве компонента косметических продуктов, и другими веществами. Более четкие выводы в этой области, очевидно, будут сделаны в результате дальнейших исследований.

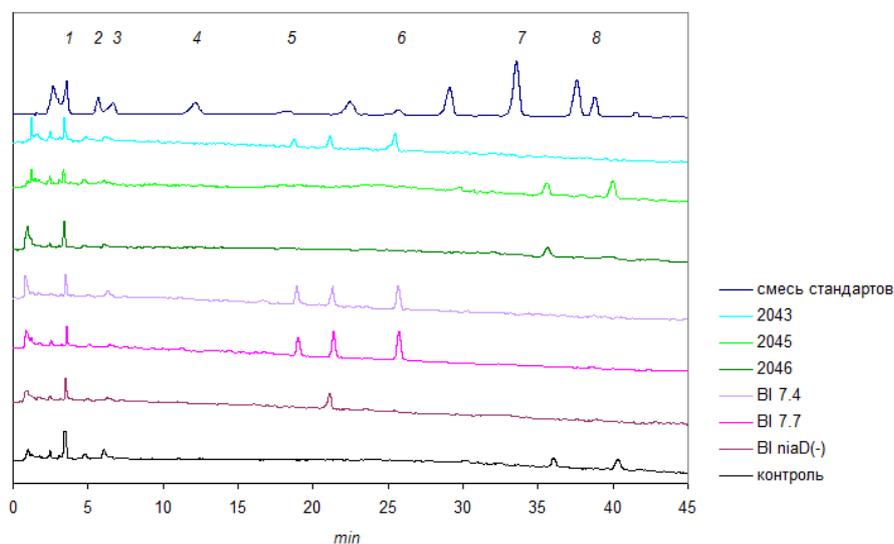


Рисунок 5 - Анализ содержания веществ фенольной природы после обработки ФП выжимок винограда сорта «Цвейильт» через 24 часа ферментативной обработки (50 °С, дозировка ФП 5 мг/г с.в. субстрата).

Номера пиков соответствуют номерам стандартов, приведенным в таблице 4.

## **5. Исследование токсичности и аллергизирующих свойств ферментного препарата ВІ 7.7**

Поскольку микроскопические грибы, в том числе *P. verruculosum*, могут быть источниками токсинов, на завершающем этапе исследований в ФП ВІ 7.7, проявившем высокую эффективность для широкого спектра растительного сырья (как при обработке плодового сырья, так и винограда и отходов винодельческого производства) определяли общее содержание афлатоксинов и охратоксина А. Кроме того, был определен уровень токсичности ФП ВІ 7.7 и выявлены его аллергизирующие свойства с использованием животных моделей крыс Wistar и Norway Brown. Эти показатели помогли оценить безопасность использования данного ФП в пищевом производстве, в частности при получении виноматериалов различного типа.

В сухом лабораторном ФП ВІ 7.7, представляющем собой лиофилизат КЖ *P. verruculosum* РВ7, были обнаружены афлатоксины, а также некоторое количество охратоксина А (таблица 5). В образце коммерческого ФП «Колор» (2045), использованного в качестве контроля, также было обнаружено наличие определяемых микотоксинов.

В таблице 5 приведены также данные, полученные путем расчета предполагаемого содержания микотоксинов в винах, обработанных ФП ВІ 7.7, исходя из количества вносимого ФП в мезгу. В образцах таких вин действительно невозможно достоверно зафиксировать присутствие охратоксина А в виду его низкого содержания, что подтверждают результаты последующих проводимых экспериментов.

Таблица 5 - Содержание микотоксинов (афлатоксинов и охратоксина А) в ферментном препарате ВІ 7.7 (лиофилизат КЖ).

<b>ФП</b>	<b>Микотоксины:</b>	<b>в 1 г белка ФП, нг</b>	<b>Предполагаемое (расчетное) содержание в 1 л вина при дозировке ФП 0,05 % от массы сырья, нг</b>	<b>Предельное содержание в ферментных препаратах в соответствии с Техническим Регламентом Таможенного Союза ТР ТС 029/2012</b>
ВІ 7.7	афлатоксины	76±2,4	50	не допускается
	охратоксин А	21,2±0,7	14*	
Колор (2045)	афлатоксины	2,8±0,3	1,4*	
	охратоксин А	29,5± 0,9	14,7*	

\* не более чем (значение ниже предела обнаружения).

Данные таблицы 6 свидетельствуют, что содержание охратоксина А в пробах вин, полученных с применением ФП ВІ 7.7, не различимо, в то время, как афлатоксины содержатся в образцах красных вин в следовых количествах (близки к пределу обнаружения либо ниже предела обнаружения, но выше предела детектирования и характеризуются высокой воспроизводимостью), что соответствует расчетным данным из таблицы 5.

Следует подчеркнуть, что свободный от афлатоксинов и охратоксина А лабораторный ФП ВІ 7.7 был получен нами ультрафильтрацией его растворов с помощью концентрирующих патронов Vivaspin 500 (мембрана PES 5,000) в центрифуге (15000 об/мин, 4 °С, 15 мин). При проведении ИФА-анализа полученных таким способом образцов микотоксинов в их составе зафиксировано не было.

В ходе исследования острой токсичности лабораторного ФП ВІ 7.7 крысам-самцам линии Wistar однократно вводили внутрижелудочно с помощью зонда растворы ФП в воде, руководствуясь методом Литчфилда-Уилкоксона (1949 г), животные наблюдались 14 дней, затем подвергались эвтаназии. Основной показатель острой токсичности вещества, его полуметальную дозу ЛД<sub>50</sub>, для ФП ВІ 7.7 установить не удалось, так как гибели крыс не наблюдалось даже после введения значительной дозы препарата (5000 мг/кг веса).

Таблица 6 - Результаты ИФА-анализа проб красного и розового столового вина, полученных с использованием ФП.

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

\* не более чем (значение ниже предела обнаружения).

Очевидно, что полулетальная доза ФП ВІ 7.7 превышает 5 г/кг веса животного, следовательно, согласно ГОСТ 12.1.007-76 данный препарат, как потенциально вредное вещество, можно условно отнести к IV классу опасности (вещества малоопасные) по степени воздействия на организм. На протяжении эксперимента не было выявлено снижения средней массы тела животных, подвергавшихся воздействию ФП. При макроскопическом исследовании видовых отличий, а также влияния пути введения на состояние и внешний вид внутренних органов установлено не было.

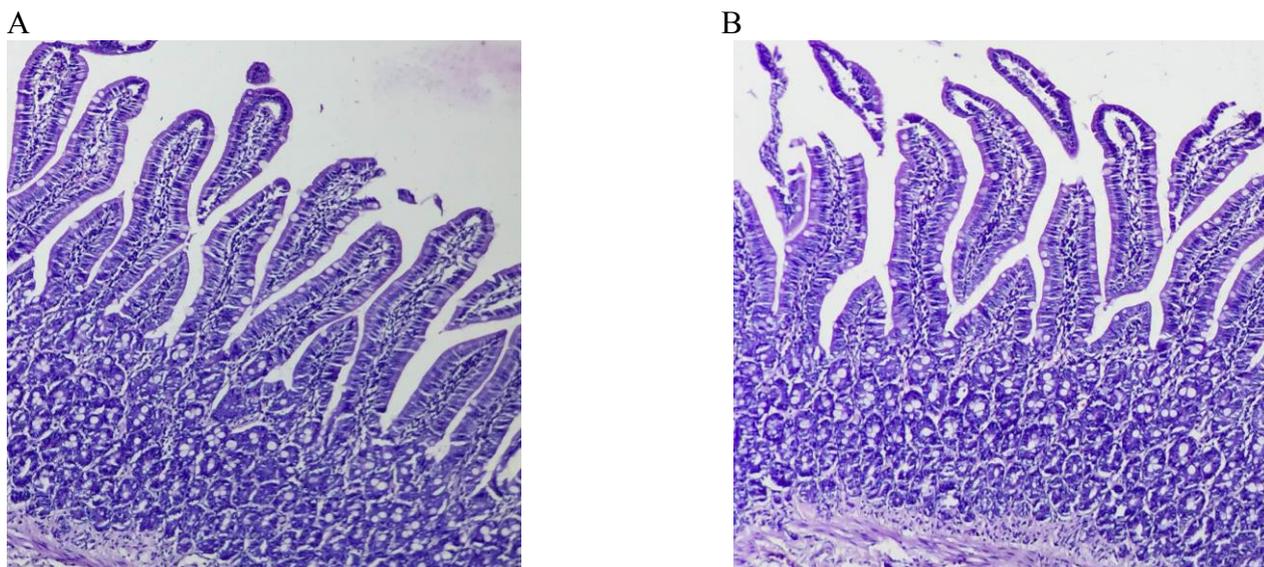
При исследовании алергизирующих свойств лабораторного ФП ВІ 7.7 использовали крыс линий Wistar и Norway Brown. Эксперименты, подразумевающие ввод ФП крысам внутрибрюшинно, не выявили реакции на сенсibilизатор. Сенсibilизацию введением ФП и экстракта виноматериала, полученного с его использованием, осуществляли также внутривентриально в течение 42 дней, при этом признаков алергической реакции (ранок на коже, изменений в поведении) обнаружено не было. После введения крысам внутривентриально разрешающей дозы сенсibilизирующих веществ животных всех групп подвергали эвтаназии со взятием мазков крови, результаты анализа которых представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты микроскопического анализа мазков крови крыс, взятых на 49 день исследования алергизирующего действия ФП ВІ 7.7 и виноматериала, полученного с его использованием.

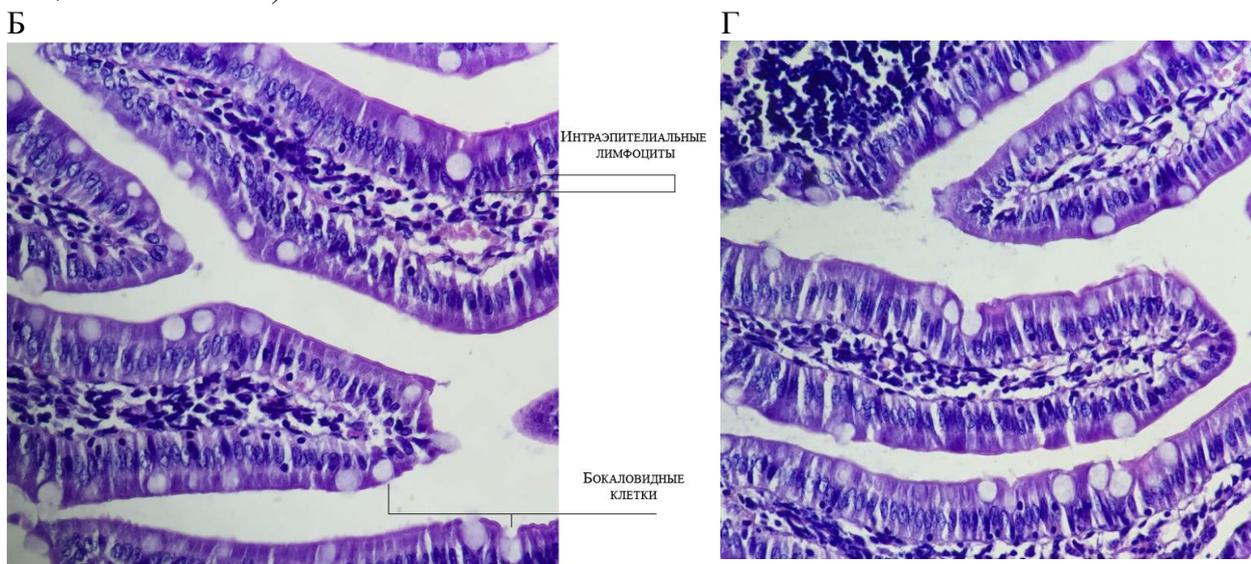
Номер группы	Сенсibilизатор	Показатели крови, % от 100 клеток			
		Нейтрофилы	Лимфоциты	Макрофаги	Эозинофилы
<i>Крысы Norway Brown</i>					
1	ФП ВІ 7.7; 350 мг белка/ кг веса	21,6±1,4	76,2±4,2	1,4±0,1	0,60±0,05
2	Экстракт п/сух виноматериала, «Цимлянский Черный»; 35 мг белка/ кг веса	34,8±2,4	61,8±4,8	2,8±0,2	0,60±0,03
3	Вода (контроль)	34,4±2,2	63,9±3,4	1,30±0,06	0,40±0,02
<i>Крысы Wistar</i>					
1	ФП ВІ 7.7; 350 мг белка/ кг веса	23,8±1,4	70,2±4,5	3,6±0,2	2,4±0,2
2	Экстракт п/сух виноматериала, «Цимлянский Черный»; 35 мг белка/ кг веса	20,8±1,4	73,8±3,9	2,2±0,1	3,2±0,2
3	Вода (контроль)	29±1,5	64,8±3,9	3,6±0,3	2,6±0,1

Как видно из данных таблицы 7, кровь крыс Norway Brown и Wistar, проходивших сенсibilизацию ФП VI 7.7 и экстрактом виноматериала, не отличалась по составу (процентному содержанию компонентов крови) от крови крыс контрольных групп. Разница в процентном содержании нейтрофилов и лимфоцитов в крови животных в пределах одной группы не превышала 20 %, макрофагов и эозинофилов – 2 %.

Из каждой группы животных выбирали двух, срезы тонкого кишечника которых подвергали гистологическому исследованию с описанием состояния ворсинок, цилиндрического кишечного эпителия, крипт (рисунок 6).



Внешний вид слизистой оболочки, продольный срез – ворсинки и крипты (окуляр  $\times 10$ , объектив  $\times 10$ ).



Внешний вид ворсинок, покрытых цилиндрическим эпителием, содержащим бокаловидные клетки и интраэпителиальные лимфоциты (окуляр  $\times 10$ , объектив  $\times 40$ ).

Рисунок 6 - Микрофотографии гистологических препаратов стенки тонкой кишки крысы Norway Brown, сенсibilизированной ФП VI 7.7 (изображения А и Б) и крысы Norway Brown из контрольной группы (изображения В и Г).

Обращали внимание на количество интраэпителиальных лимфоцитов в цилиндрическом эпителии и количество лимфоцитов, плазматических клеток, эозинофилов и нейтрофилов в собственной пластинке слизистой оболочки. По результатам гистологического исследования не было выявлено различий по описанным критериям в группах контроля и опытных группах животных, что говорит об отсутствии негативного воздействия ФП и экстракта виноматериала на эпителий тонкого кишечника.

Итак, исследования, направленные на выявление токсикологических и аллергизирующих свойств ФП ВІ 7.7, показали повышенное содержание в нем афлатоксинов, очистку от которых удалось провести путем ультрафильтрации растворов препарата. В винах, полученных с помощью неочищенного ФП ВІ 7.7, были обнаружены следовые количества афлатоксинов, присутствие охратоксина А не удалось зафиксировать ввиду его низкого содержания. Полулетальная доза ФП для крыс (основной показатель острой токсичности) превысила 5 г/кг веса животного, влияния ФП и пути его введения на состояние, внешний вид и функциональные изменения внутренних органов у опытных животных установлено не было.

Сенсибилизация крыс ФП ВІ 7.7 и экстрактом виноматериала из винограда сорта «Цимлянский Черный», полученного с его помощью, посредством внутрижелудочного введения в течение 42 дней с последующим введением разрешающей дозы сенсибилизаторов не выявила признаков аллергической реакции у животных.

## ВЫВОДЫ

1. С помощью генетически модифицированных штаммов *P. verruculosum* PB4 и PB7 получены и охарактеризованы новые ФП ВІ 7.4 (ПЕЛ – 35 %, ЦБГ – 42 %, ЭГ – 10 %, БГЛ – 12 %, другие компоненты – 2 %) и ВІ 7.7 (ПЕЛ – 33 %, ЦБГ – 40 %, ЭГ – 9 %, БГЛ 5 %, другие компоненты – 12 %), содержащие комплекс ферментов, необходимых для эффективной биоконверсии полисахаридов плодового и ягодного сырья.

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

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

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

5. Определены показатели токсичности и алергизирующие свойства ФП ВІ 7.7, проявившего высокую гидролитическую способность для наиболее широкого спектра плодов различного состава. В сухом лабораторном ФП ВІ 7.7,

представляющем собой лиофилизат КЖ микроскопического гриба *P. verruculosum*, были обнаружены афлатоксины, а также некоторое количество охратоксина А. Фиксируемое количество афлатоксинов в виноградных винах, полученных с помощью неочищенного ФП, из сортов «Цимлянский Черный», «Изабелла» и «Ркацители» было близко к пределу обнаружения методом ИФА и составляло от 30 до 50 нг/л. Охратоксин А обнаруживался в ряде виноматериалов в следовых количествах, близких к пределу детектирования (от 10 до 15 нг/л). В водном растворе ФП ВІ 7.7, прошедшем стадию ультрафильтрации, присутствия охратоксина А и афлатоксинов не обнаружено. В винах, полученных с помощью очищенного ФП ВІ 7.7, указанные микотоксины отсутствовали.

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

## СПИСОК РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Издания, входящие в перечень ВАК РФ:

1. **Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербаков С.С., Сеницын А.П., Бушина Е.В.** Использование ферментных комплексов нового поколения для обработки различных плодово-ягодных субстратов // Журнал «Виноделие и Виноградарство». –2012. –№ 1.–С. 20-21.
2. **Волчок А.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербаков С.С., Сеницын А.П.** Ферментные комплексы нового поколения для соковой промышленности // Журнал «Биотехнология». –2013. –№ 5. –С. 78-89.
3. **Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербаков С.С., Сеницын А.П.** Предобработка виноградной мезги ферментными препаратами нового поколения при изготовлении столовых вин // Журнал «Виноделие и Виноградарство». –2014. –№ 1. –С. 36-39.
4. **Volchok A.A., Rozhkova A., Zorov I., Shcherbakov S., Sinitsyn A.** Production of fruit wines using novel enzyme preparations // Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. –2015. –Т. 53. –№ 3. –Р. 205-215.
5. **Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербаков С.С., Сеницын А.П.** Использование новых мультиферментных комплексов в производстве фруктовых вин // Журнал «Известия ТСХА». –2015. –№ 5. –С. 121-131.

### Материалы конференций:

1. **Volchok A.A., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyn A.P.** Processing of wine industry wastes using enzymatic preparations based on recombinant strains of fungi *Penicillium* // Международный конгресс «Биомасса: топливо и энергия». Москва. –2012. –С. 23.
2. **Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Сеницын А.П.** Снижение вязкости плодово-ягодного суслу под воздействием ферментных препаратов на основе рекомбинантных штаммов грибов рода *Penicillium* // Третья научно-практическая конференция с международным участием «Управление реологическими свойствами пищевых продуктов», научная конференция молодых ученых и специалистов. Сборник материалов. МГУПП. Москва. – 2012. –С. 124-127.
3. **Volchok A.A., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Sinitsyn A.P.** The pre-processing of berry raw materials by enzyme preparations based on recombinant strains of *Penicillium* fungi // International conference biocatalysis, fundamentals and applications. Moscow. –2013. –Р. 116.
4. **Волчок А.А., Рожкова А.М., Бушина Е.В., Зоров И.Н., Сеницын А.П.** Мультиферментные комплексы пектиназ и целлюлаз в производстве

виноградных и плодовых вин // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. Сборник научных трудов. М.: ВНИИПБТ. –2014. –С. 144-149.

**Патент:**

*Синицын А.П., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Синицына О.А., Бушина Е.В., Волчок А.А., Матыс В.Ю., Окунев О.Н., Черноглазов В.М.* Патент РФ на изобретение «Новый рекомбинантный штамм (варианты) мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* и ферментный препарат (варианты), предназначенный для гидролиза плодово-ягодного сырья, и способ его получения» № 2574206 от 10.02.2016 г.