На правах рукописи

Золотарёв Никита Александрович

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ТВОРОЖНОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ ТВОРОЖНОЙ СЫВОРОТКИ

05.18.04 - Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

МОСКВА – 2020

Работа выполнена в Федеральном Государственном автономном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»).

Научный руководитель: Доктор технических наук, старший научный сотрудник
Федотова Ольга Борисовна

Официальные оппоненты: **Гаврилов Гавриил Борисович**
Доктор технических наук,
ГБУ ЯО «Ярославский государственный институт качества сырья и пищевых продуктов», директор

Острецова Надежда Геннадьевна
Кандидат технических наук,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина», кафедра технологии молока и молочных продуктов, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет»

Защита состоится «____»_____2020 года в _____часов

на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу 109316, Москва, Талалихина, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН: www.vniimp.ru

Автореферат разослан «_____»_____2020 года.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат технических наук,

старший научный сотрудник А.Н. Захаров

Актуальность работы

По данным ассоциации Союзмолоко общий объем сыворотки в 2019 году в России составил около 6,8 млн. тонн, из которых переработке подвергается не более 45 % и то, в основном, подсырной.

Особенность российского производства сыворотки заключается в том, что 60 % от общего объема ее составляет творожная сыворотка, переработка которой имеет свои технологические нюансы, в виду особенностей ее химического состава и физико-химических свойств (Мельникова Е.И.).

Известна высокая биохимическая загрязняющая способность молочной сыворотки при ее сбросе в окружающую среду. Одной из задач Программы «Охрана окружающей среды» (Постановление Правительства РФ № 326) является снижение негативного воздействия на окружающую среду.

Одновременно известно, что молочная сыворотка, являясь побочным сырьем молочного производства, является «кладезем» полезных веществ, в частности, белка и лактозы. Совершенствование биотехнологических процессов переработки вторичных сырьевых ресурсов, к которым относится сыворотка, относится к приоритетным стратегическим задачам и корреспондируется с направлениями Стратегии развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации на период до 2030 года (Распоряжение Правительства РФ № 559-р), в которых подчеркивается необходимость внедрения новых технологий, в том числе, биотехнологий позволяющих значительно расширить выработку продуктов нового поколения с заданными качественными характеристиками.

В связи с вышеизложенным, разработка технологии творожного продукта профилактической направленности с использованием гидролизатов белков творожной сыворотки, является актуальной задачей**.**

Поискам новых путей глубокой переработки молочной сыворотки посвятили свои труды известные ученые Гаврилов Г. Б., Евдокимов И. А., Жидков А. В., Липатов Н. Н. (ст.), Лодыгин А. Д., Рябцева С. А., Синкевич Т., Ридель К. Храмцов А. Г, Van der Ven. Известные ученые такие, как Антипова Т. А., Агаркова Е. Ю, Банникова А. В, Королева О. В., Круглик В. И., Мельникова Е.И., Остроумов Л. А., Просеков А. Ю., Харитонов В. Д., Храмцов А. Г., Renda Kankanamge Chaturika Jeewanthi, Hyun-Dong Paik, в своих работах высказали мнение о перспективности использования сывороточных белков и их гидролизатов в качестве ингредиентов для создания продуктов профилактического и функционального назначения массового потребления.

Цель и задачи

Целью работы является разработка технологии творожного продукта с «аддитивным белком» (от англ. addition – добавление) творожной сыворотки, полученным за счет ее биокаталитической конверсии ферментным препаратом отечественного производства.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

- изучить научно-техническую литературу по теме работы;

-провести сравнительную оценку ферментных препаратов отечественного производства для направленного гидролиза белков творожной сыворотки и оптимизировать процесс их биокаталитической конверсии;

-исследовать свойства полученных гидролизатов (степень гидролиза, антиоксидантная активность, степень горечи);

- исследовать влияние разработанного состава творожных продуктов с гидролизатом и концентратом творожной сыворотки на комплекс показателей образцов творожных продуктов и стабильность их структуры;

-определить пищевую, биологическую и энергетическую ценность разработанных образцов продукта;

- определить рациональные технологические параметры производства творожных продуктов с использованием гидролизатов белков творожной сыворотки и комплект технической документации на разработанные творожные продукты, провести их промышленную апробацию.

Научная новизна

Проведен научно-обоснованный подбор ферментных препаратов для направленного гидролиза белков творожной сыворотки.

Доказана зависимость степени гидролиза и антиоксидантной активности от температуры процесса биокаталитической конверсии, его продолжительности и дозы вносимого ферментного препарата.

Установлена зависимость динамики титруемой кислотности творожного продукта от содержания в нем гидролизата сывороточных белков.

Научно обоснованы и экспериментально подтверждены рациональные параметры технологии творожного продукта «аддитивным белком» творожной сыворотки.

Теоретическая и практическая значимость

Создание нового продукта профилактической направленности основывалось на направленном биокатализе творожной сыворотки с получением пептидов средней длины с желаемой молекулярной массой и, как следствие, комплексом свойств.

Разработана технология творожного продукта с применением гидролизата белков творожной сыворотки, полученной с применением ферментного препарата отечественной разработки. Разработаны и утверждены ТУ 10.51.56-060-00419785-2019 на творожный продукт с гидролизатом сывороточных белков «Мусс творожный».

Осуществлена промышленная апробация разработанного продукта на ООО «МОЛОДЕЛ».

Методология и методы исследования. Методология исследований базируется на развитии научных подходов к направленной переработке творожной сыворотки.

При проведении исследований использовали общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследований – органолептические, микробиологические, физико-химические.

Положения, выносимые на защиту

Научно-обоснованный подбор ферментного препарата отечественного производства для направленного биокатализа молочной сыворотки.

Оптимизация процесса биокатализа с получением гидролизата, содержащего пептиды средней длины.

Разработка нового творожного продукта, содержащего «аддитивный белок» творожной сыворотки.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена соискателем лично, включая анализ литературных источников, научное обоснование и постановку проведения исследований, получение и обобщение теоретических и экспериментальных данных, формулирование основных результатов и выводов, подготовка материалов к опубликованию, участие в конференциях, участие в проведении апробации.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов подтверждается проведением исследований на сертифицированном оборудовании, использованием методов статистической обработки полученных экспериментальных данных с применением компьютерных программ; промышленная апробация работы.

Основные положения и результаты работы были обсуждены в рамках X Международной научной конференции студентов и аспирантов, Могилевский государственный университет продовольствия», г. Могилев, 2016 г.; XIII Международной научно-практической конференции, ФГБОУ Красноярский ГАУ, СФНЦА РАН, г. Красноярск, 2016 г.; III Международной научно-технической конференции «Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство», ВГУИТ, г. Воронеж, 2016 г.; XI Международной научно-технической конференции, Могилевский государственный университет продовольствия, г. Могилев, 2017 г.; XI Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук «Пищевые системы: теория, методология, практика», ВНИХИ – филиал ФГБНУ «ФИЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова», г. Москва, 2018 г., Международной научно-технической конференции «Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство», ВГУИТ, г. Воронеж, 2018 г.; XI Международной научной конференции студентов и аспирантов, Могилевский государственный университет продовольствия, г. Могилев, 2019 г.

Получен диплом лауреата конкурса на лучшую научно-исследовательскую работу в рамках XI международной научно-практической

конференции молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук РАН «Пищевые системы: теория, методология, практика» 1 ноября 2018 г., г. Москва.

Публикации.

По теме диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, из которых 3 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 1 в издании из списка WOS.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, экспериментальной части, основных результатов и выводов, списка использованной литературы, содержащего 204 отечественных и зарубежных источников. Работа изложена на 152 страницах, включает 38 таблиц, 34 рисунка и 3 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, представлена научная новизна, практическая значимость, сформулирована цель и задачи для ее достижения.

В **первой главе** рассмотрены современные способы глубокой переработки молочной сыворотки; функциональные продукты, получаемые с использованием модификации молочных белков; ферментные препараты для получения гидролизатов творожной сыворотки. Сделаны выводы о перспективности использования творожной сыворотки в качестве сырья как с точки зрения наиболее полного извлечения биологически ценных веществ, так и с точки зрения экологической составляющей и безотходности производства и разработки продуктов с использованием этих веществ.

Во второй главе приведена характеристика объектов и методов исследования, а также его организация.

Работа выполнена на базе ФГАНУ «ВНИМИ»; Института биохимии им. А. Н. Баха РАН (лаборатории молекулярных основ биотрансформаций); «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Блок-схема организации проведения исследований представлена на рисунке 1.

Объектами исследований являлись: сыворотка молочная творожная по ГОСТ 34352-2017;молочно-белковые концентраты белков творожной сыворотки, полученные с использованием ультрафильтрации (КСБ); кислые протеазы продуцентов Aspergillus niger (активность 600 ед/г) и Aspergillus oryzae (активность 400 ед/г), разработанные в ФНБНУ ВНИИПБТ (ФП); гидролизаты белков творожной сыворотки, полученные путем применения кислых протеаз грибкового происхождения (ГСБ);творог 9 %-ной жирности по ГОСТ 31453-2013; сливки 10 %-ной жирности по ГОСТ 31451-2013;масло сливочное «Крестьянское» по ГОСТ 32261-2013.

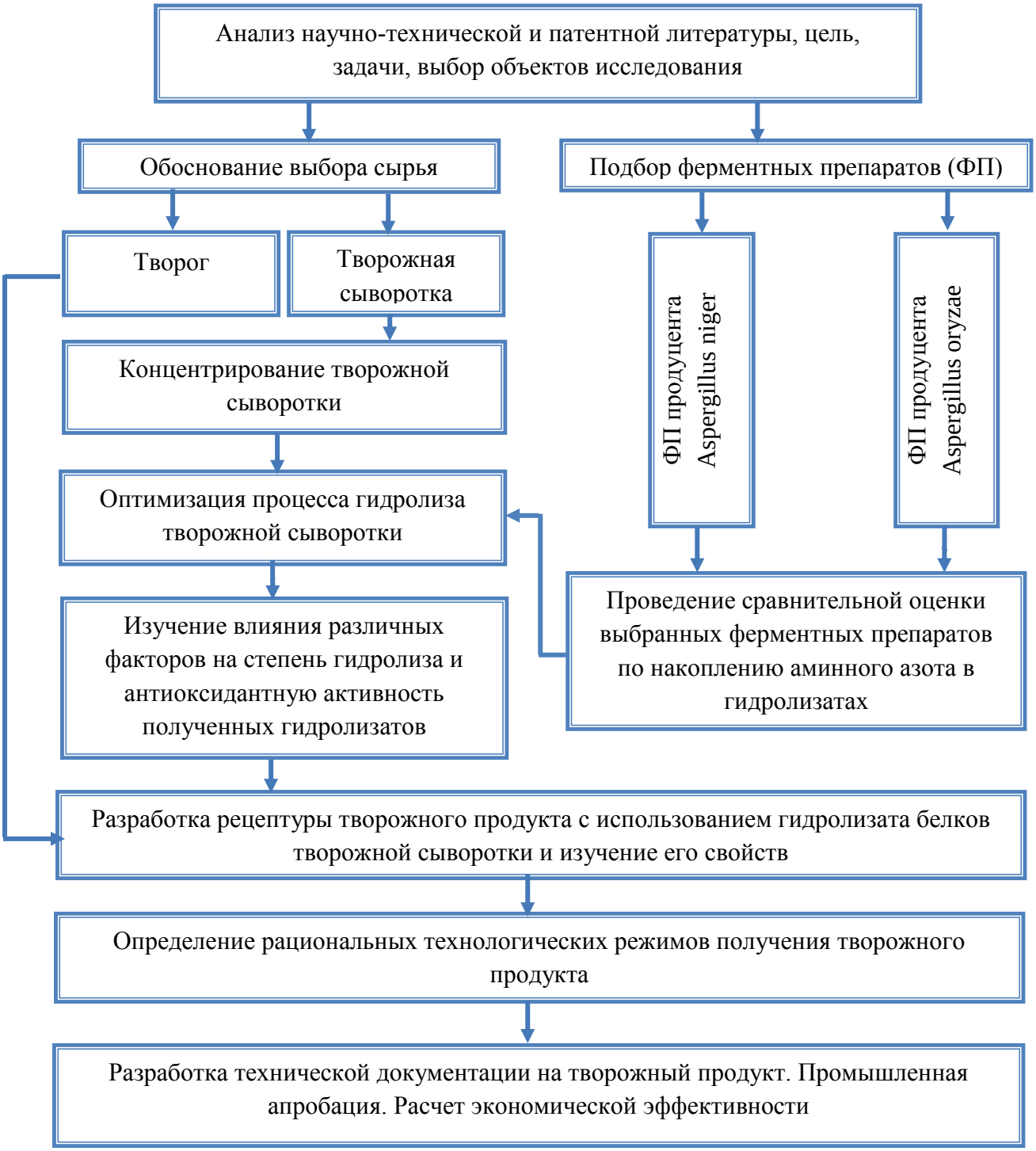


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

В работе использовались общепринятые стандартизованные и адаптированные под конкретные задачи методы исследований.

Отбор проб и подготовку их для определения физико-химических показателей проводили в соответствии с ГОСТ 26809.1-2014; массовую долю влаги и сухих веществ определяли по ГОСТ Р 54668-2011; массовую долю

жира определяли кислотным методом Гербера по ГОСТ 5867-90; массовую долю белка измеряли методом Кьельдаля по ГОСТ 34454-2018; массовую долю небелкового азота определяли методом Кьельдаля по ГОСТ Р 55246-2012; массовую долю лактозы измеряли по ГОСТ 34304-2017 ;определение массовой доли углеводов проводили по ГОСТ Р 54667-2011; определение титруемой кислотности - титриметрическим методом по ГОСТ 54669-2011; активную кислотность -потенциометрическим методом в соответствии с ГОСТ 32892-2014; взбитость творожного продукта - по ГОСТ 31457-2012.

Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) и бактерий группы кишечных палочек (БГКП) опытных образцов творожных продуктов осуществляли по ГОСТ 32901-2014.

Органолептические исследования проводили согласно ГОСТ ISO 6658-16. Углубленный анализ органолептических показателей образцов проводили с применением теста «дуо-трио» по ГОСТ ISO 10399-2015. Оценку консистенции- в соответствии ГОСТ ISO 11036-2017. Построение сравнительных диаграмм- с использованием руководящих указаний по ГОСТ ISO 4121-16, профильных диаграмм в соответствии с ГОСТ ISO 13299-2015.

Рекомендуемые сроки годности определяли в соответствии с МУК 4.2.1847-04.

Оценка степени синерезиса основана на определении количества сыворотки, выделившейся при центрифугировании 10 г творожного продукта в течение 10 мин при частоте вращения 4000 мин$^{-1}$.

Концентрат белков творожной сыворотки белков получали на пилотной ультрафильтрационной установке AL 362 производства компании ООО «Альтаир». Протеолиз творожной сыворотки проводили в колбах 250 мл на многопозиционной магнитной мешалке с подогревом IKA RT5 Power (IKA Werke, Германия). Определение аминного азота в ГСБ-медным способом. Степень гидролиза-спектрофотометрическим методом согласно методике Spencer J. F. T. Антиоксидантную активность in vitro определяли по отношению к катион-радикалу АБТС.

Молекулярно-массовое распределение КСБ и ГСБ определяли методом ВЖХ. В качестве основной протеомной технологии применяли ДЭФ по О`Фарреллу.

Реологические характеристики образцов творожных продуктов определяли на ротационном вискозиметре «Реотест-2».

Обработку результатов экспериментов осуществляли с использованием блока DOE программы пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), MS Excel 2010. Повторность проведения опытов не менее, чем трех-пятикратная.

В третьей главе представлены результаты исследований и их обсуждение.

3.1 Сравнительная оценка ферментных препаратов и исследование эффективности их действия

В соответствии с поставленными задачами на первом этапе исследовательской работы была проведена сравнительная оценка ФП, продуцентов Aspergillus oryzae (ФП-1) и Aspergillus niger (ФП-2). Масс-спектры в совокупности с результатами электрофореза позволили охарактеризовать их, как аспергиллопепсин, аспартатная протеаза repA.

Была поставлена промежуточная задача оценить динамику накопления аминного азота в гидролизатах с применением ФП с различной дозой их внесения. Предварительные исследования позволили выбрать рациональные условия процесса. Гидролиз проводили в стационарной емкости с возможностью регулирования температуры гидролиза в течение 2 часов при температуре 30 °С при постоянном перемешивании. После проведения гидролиза, образцы подверглись пастеризации для инактивации фермента при температуре 80 °С с выдержкой в 15 минут.

Далее производился расчет содержания аминного азота и степени гидролиза, выраженной как отношение аминного азота к общему. На основании полученных данных построена зависимость (рис. 2) накопления аминного азота от дозы вносимого ферментного препарата.

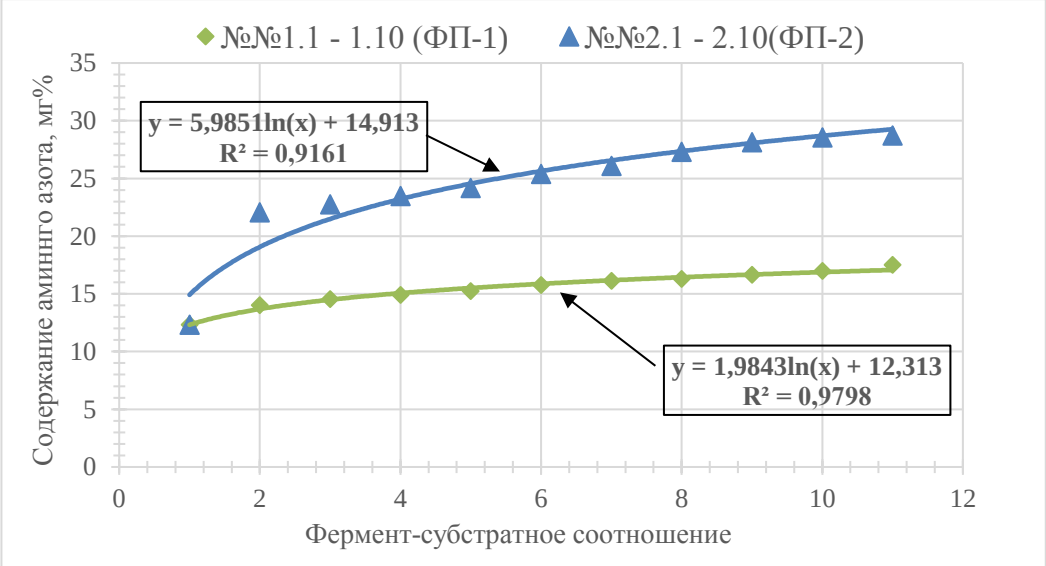


Рисунок 2 – Динамика накопления аминного азота в процессе гидролиза белков творожной сыворотки кислыми протеазами (ФП-1 и ФП-2).

По результатам исследования накопления аминного азота в процессе гидролиза рис. 2 можно заключить, что его количество при использовании различных доз внесения ФП-1практически не изменяется. При этом максимальная степень гидролиза составляет 3,7 %. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что данный фермент слабо катализирует реакции расщепления полипептидной цепи. При минимальном фермент-субстратном соотношении (E/S=0,5) степень гидролиза ФП-2 составила 7,7 %, а в максимальной точке (E/S=9,5) достигла примерно 13 %. Таким образом, данный ферментный препарат наиболее эффективен при выбранных режимах проведения процесса гидролиза.

Исследовано влияние продолжительности процесса гидролиза на степень гидролиза белков (рис. 3).

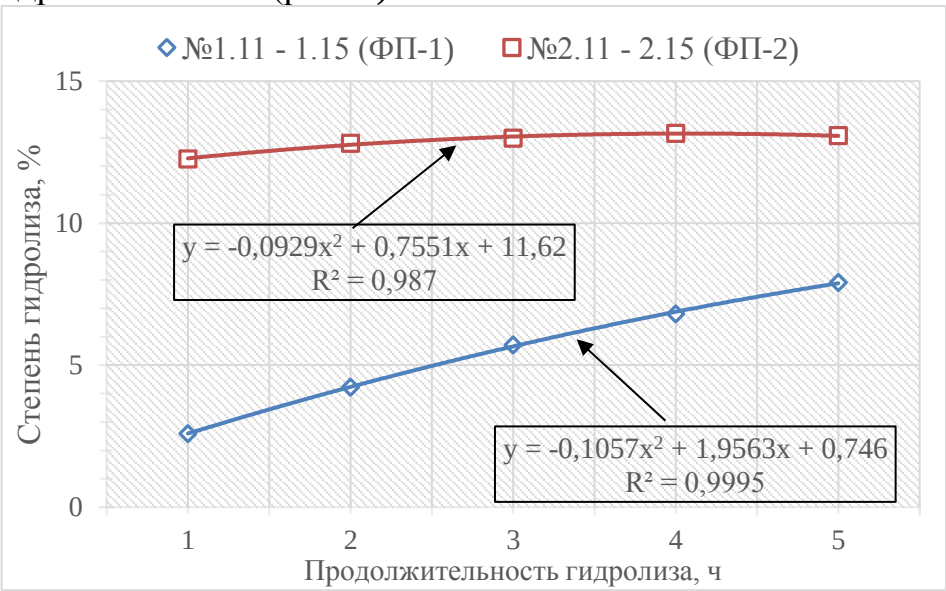


Рисунок 3 – Зависимость степени гидролиза от продолжительности процесса

С увеличением продолжительности гидролиза достигается максимальная степень гидролиза ФП-2 - 13,2 % и далее происходит ингибирование, что свидетельствует об окончании каталитических процессов. Слабая эффективность действия ФП-2 связана, вероятнее всего, с высоким значением гидромодуля, т.е. с высоким содержанием воды и низким содержанием белка в нативной творожной сыворотке.

Полученные результаты подтвердили необходимость предварительного концентрирования творожной сыворотки с целью увеличения содержания белка в образцах. Для этого использована ультрафильтрация (УФ). Фактор концентрирования составил 3,6, массовая доля белка полученного УФ-концентрата - 3,28 %. С целью установления однородности условий проведения эксперимента, pH концентрата белков творожной сыворотки был доведен до значения 4,6 ед. 80 %-ной молочной кислотой. После проведения гидролиза, исследовали динамику накопления аминного азота и рассчитывали степень гидролиза в полученных образцах. Кроме того, оценивали наличие/отсутствие горького привкуса полученных гидролизатов.

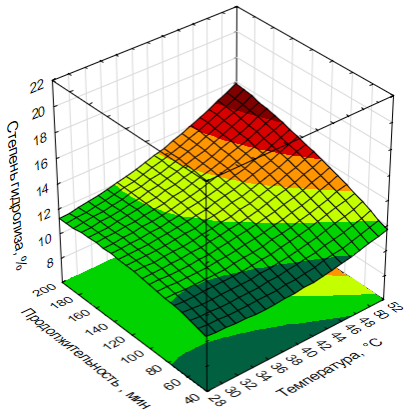
При использовании ФП-1 при минимальном фермент-субстратном соотношении (0,5) степень гидролиза составила 1,2 %, а максимальная степень гидролиза отмечена при фермент-субстратном соотношении 8,5 и составила 8,43 %. Тогда как, при минимальной активности фермента ФП-2 степень гидролиза составила 7,03 %, а при максимальной – 13,8 %.

При использовании ферментного препарата ФП-1 первые признаки горечи были отмечены при фермент-субстратном соотношении 3,5 и степени гидролиза 4,5 %. В гидролизатах, выработанных с применением ФП-2 горький привкус ощущался при активности фермента 7,5 ед/см^3 и усиливался с ее увеличением.

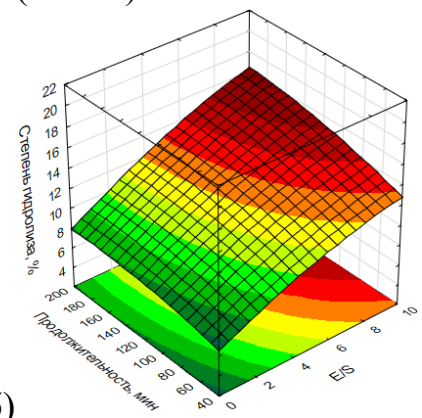
Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ФП-1обладает низкой эффективностью и придает полученным гидролизатам горечь, которая может заметно повлиять на органолептический профиль разрабатываемого продукта. Учитывая вышесказанное, на следующем этапе, для оптимизации процесса гидролиза и разработки продукта, выбран ферментный препарат продуцента Aspergillus oryzae.

3.2 Оптимизация условий ферментативного гидролиза

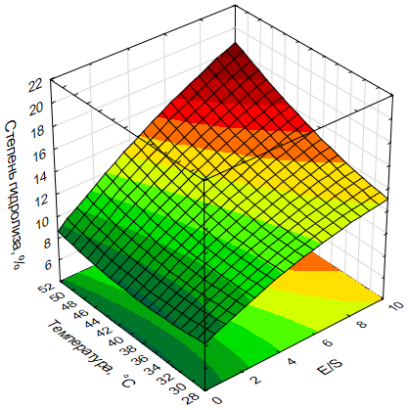
Для оптимизации условий ферментативного гидролиза творожной сыворотки был проведен полнофакторный эксперимент с 3 вариабельными параметрами: температура (X_1), продолжительность гидролиза (X_2) и субстрат-ферментное соотношение E/S (X_3). Каждый из параметров варьировали на трех уровнях. Выходными параметрами являлись степень гидролиза (DH) и антиоксидантная активность (TEAC).



а)



б)



в)

а) Зависимость степени гидролиза от продолжительности и температуры процесса;
б) Зависимость степени гидролиза от продолжительности процесса и субстрат-ферментного соотношения;
в) Зависимость степени гидролиза от температуры процесса и субстрат-ферментного соотношения;

$$Y = 17{,}197 - 0{,}49699*X_1 + 0{,}0051056*X_1^2 - 0{,}37351*X_2 + 0{,}053083*X_1*X_2 - 0{,}30944*X_2^2 + 0{,}0050243*X_3 + 0{,}021906*X_1*X_3 + 0{,}085669*X_2*X_3 - 0{,}030963*X_3^2 \quad (1)$$

Рисунок 4 – Зависимость степени гидролиза в гидролизатах УФ-концентрата творожной сыворотки от вариабельных параметров при среднем уровне третьего фактора

Получены зависимости антиоксидантной активности в гидролизатах УФ-концентрата творожной сыворотки от продолжительности и температуры процесса; от продолжительности процесса и субстрат-ферментного соотношения от температуры процесса и субстрат -

ферментного соотношения. Все исследуемые вариабельные факторы не оказывают значимое ($p>0,05$) влияние на антиоксидантную активность. Значимое влияние ($p<0,05$) оказывает линейный фактор дозы вносимого ФП.

Получена зависимость антиоксидантной активности от вариабельных факторов процесса ферментативного гидролиза УФ-концентрата творожной сыворотки:

$$Y=6,018+1,409*X_3 \quad (2)$$

По результатам поэтапной статистической оценки получены оптимальные условия гидролиза белков творожной сыворотки: температура процесса 46,4 %; продолжительность 180 мин, доза вносимого ФП 9,5 %; антиоксидантная активность при этом составила 7,5 ТЭ ммоль/л при степени гидролиза 17,96 %.

3.3 Оценка свойств гидролизата, полученного при оптимальных условиях процесса гидролиза

Методом ВЭЖХ и двухмерного электрофореза, было исследовано молекулярно-массовое распределение пептидов в гидролизате. Результаты представлены на рис. 5. Построена диаграмма (рис. 6) молекулярно-массового распределения пептидов УФ-концентрата и белкового гидролизата.

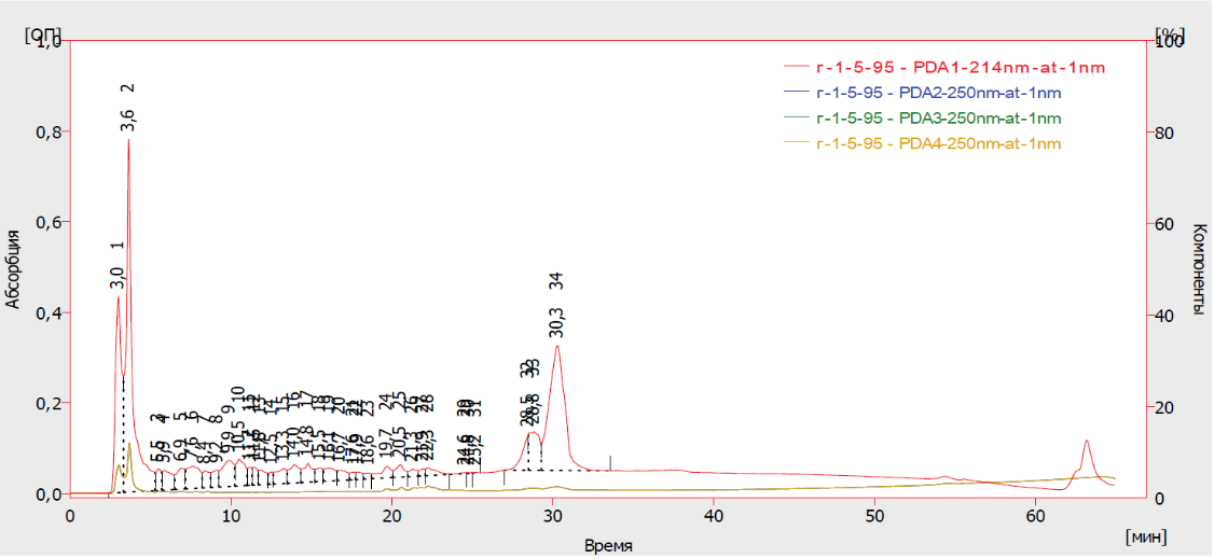


Рисунок 5 - Хроматограмма распределения пептидных фракций в гидролизате белков творожной сыворотки

Анализ полученных данных показал, что в полученном гидролизате белков творожной сыворотки заметно снизилось (примерно в 2 раза) содержание высокомолекулярных пептидных композиций по отношению к УФ- концентрату. При этом содержание пептидов с молекулярной массой 3,5 — 5 кДа увеличилось почти в 10 раз. Увеличилось и содержание компонентов с молекулярной массой менее 3,5 кДа примерно в 1,5 раза. Согласно литературным данным, практический интерес представляет получение гидролизатов со степенью гидролиза 5-20 % с большим содержанием пептидов средней длины (3-10 кДа), которые могут быть использованы в специализированном и функциональном питании.

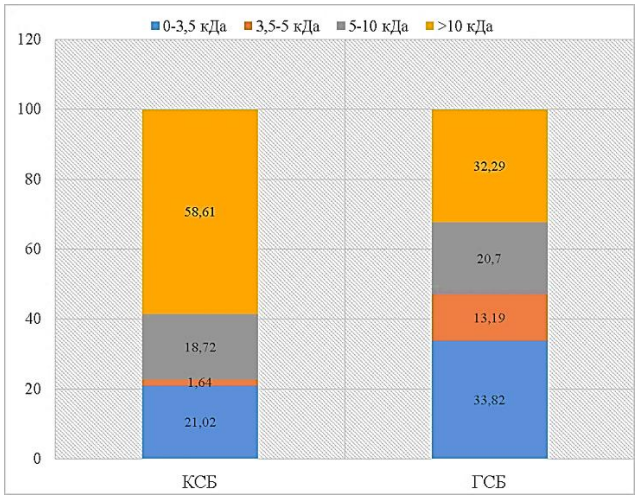


Рисунок 6 – Молекулярно-массовое распределение пептидных композиций

Таким образом, выбранные условия проведения процесса гидролиза позволяют провести направленный биокатализ белков творожной сыворотки с получением гидролизата с заданными свойствами.

Были составлены рецептуры образцов творожных продуктов с использованием КСБ и ГСБ, варьирование которых осуществлялось от 10 до 100 % с шагом 10 %. Представляло интерес проведение сравнительных исследований по установлению влияния дозы вносимого ГСБ на структуру творожного продукта, как по сравнению с исходной рецептурой, так и рецептурой, в состав которой включен КСБ.

В соответствии с разработанными рецептурами (20 вариантов) выработаны образцы и проведена их органолептическая оценка. Анализ органолептических показателей проводился в два этапа. На первом этапе был составлен органолептический профиль экспериментальных образцов в произвольной форме. То есть дегустаторы оценивали образцы творожного продукта, не обладая информацией о его составе. Второй этап анкетирования дегустаторов проводился с применением методологии "дуо-трио" с категоризацией органолептических показателей по основным группам: вкус, запах, внешний вид и консистенция, цвет. Идентифицированные дескрипторы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Дескрипторы, идентифицированные в ходе органолептического анализа

Внешний вид и консистенция	Вкус	Запах	Послевкусие	Цвет
Плотная Вязкая Рыхлая Нежная Мажущаяся Пастообразная Крупитчатая Мучнистая Однородная Неоднородная	Сливочный Кисломолочный Кислый Затхлый Горький	Сливочный Кисломолочный Кислый Затхлый	Сливочное Кисломолочное Кислое Горькое	Кремовый Желтоватый Кремовый Белый с кремовым оттенком Белый Белый с серым оттенком

В результате дескриптивного анализа органолептических показателей экспериментальных образцов в настоящей работе предложена бальная система, где 3 – удовлетворительно, 5 – отлично. Шаг в данной системе оценки выбран 0,5, что соответствует незначительным (еле заметным) изменениям органолептических характеристик.

В результате исследований показано, что с увеличением количества внесенного КСБ в рецептуру творожного продукта изменения претерпевали все органолептические характеристики. Опираясь на полученные данные, можно рекомендовать внесение КСБ в рецептуру творожного продукта в соотношении 50 %. Данный образец обладает гармоничных вкусом и запахом и плотной пастообразной консистенцией.

Результаты органолептической оценки экспериментальных образцов творожных продуктов с ГСБ, представлен на рис 7. Рекомендуемая доза внесения ГСБ составляет 40 % (образец № 14).

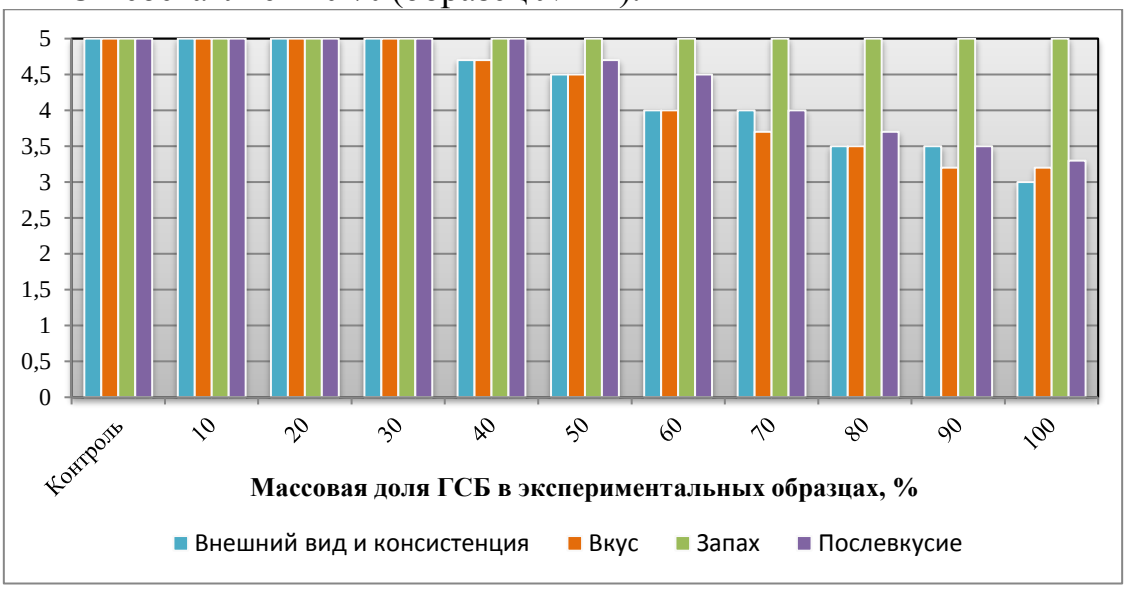


Рисунок 7 – Органолептический профиль экспериментальных образцов творожных продуктов с ГСБ

Микробиологические показатели полученных экспериментальных образцов творожных продуктов с «аддитивным белком», определяли с использованием методологии, изложенной в МУК 2.4.2.1847-04. Для проведения исследования образцы были заложены на хранение при температуре (4±2) °С на 15 суток, в течение этого времени проводили микробиологические исследования по следующим показателям: наличие БГКП в 1 г, 0,1 г и 0,01 г; количество дрожжей и плесеней в 1 г.

В течение всего исследования БГКП не были обнаружены во всех исследуемых объемах во всех образцах. Результаты исследования содержания дрожжей и плесеней в образцах при их хранении свидетельствуют, что, до 7 суток рост дрожжей и плесеней не был отмечен, затем произошел скачок их роста в отдельных образцах, в том числе, в

контрольном. Показано, что гидролизат белков творожной сыворотки положительно влияет на микробиологические показатели. Это, возможно, обусловлено наличием антимикробных пептидов, ингибирующих рост патогенной микрофлоры, вызывающей порчу продуктов.

В соответствии с поставленными задачами, оценивали зависимость значений активной кислотности готовых образцов творожных продуктов от дозы внесения КСБ и ГСБ. Данные представлены на рисунке 8.

Анализируя полученную зависимость, следует заключить, что с увеличением дозы внесения в продукт концентрата и гидролизата белков творожной сыворотки происходило плавное, без резких скачков нарастание титруемой кислотности. Это обусловлено физико-химическими свойствами исходного сырья, то есть творожной сыворотки. При этом максимальный прирост титруемой кислотности составляет 16 ºТ при массовой доле КСБ в продукте 100 % (образец №10) и 24 ºТ при 100 % ГСБ (образец №20). Стоит отметить, что полученные данные коррелируют с данными органолептической оценки выработанных образцов творожных продуктов.

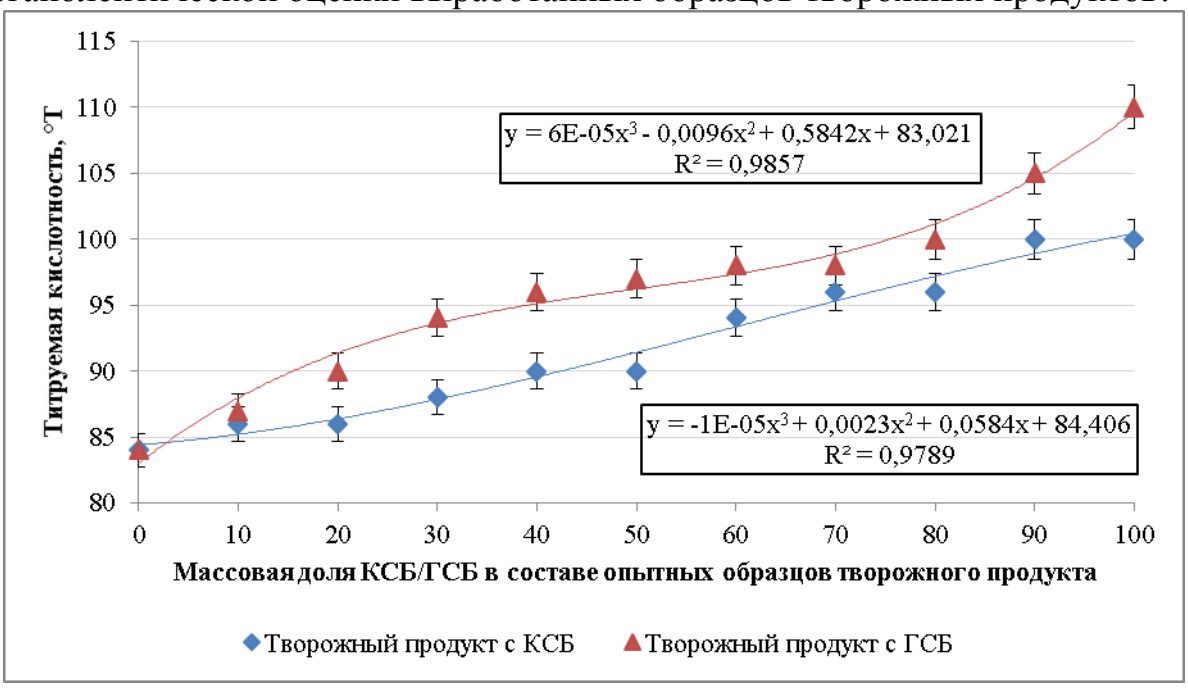


Рисунок 8 – Зависимость титруемой кислотности от массовой доли КСБ и ГСБ в экспериментальных образцах

Поскольку значительная часть технологических операций при производстве эмульсионных продуктов сопровождается созданием или разрушением структуры, физико-механические свойства являются важнейшими для сохранения устойчивости эмульсионной системы, предупреждая расслоение продукта.

Исследование структурно-механических характеристик опытных образцов творожных продуктов с применением ГСБ (рисунок 9 и 10) показало, что начальная вязкость контрольного образца и образцов с

содержанием ГСБ 10 – 30 % имела наибольшие значения в отличие от остальных (градиент напряжения на срез 0,1667 – 0,9 $с^{-1}$).

При увеличении массовой доли вносимого гидролизата, начиная с образца №14 (40 % ГСБ), отмечено резкое снижение начальной вязкости. Также, как и в случае с применением концентрата сывороточных белков, с увеличением градиента напряжения на срез происходило плавное снижение вязкости, с последующим замедлением и выходом на «плато» кривых течения при максимальных градиентах напряжения на срез (более 8.1 $с^{-1}$).

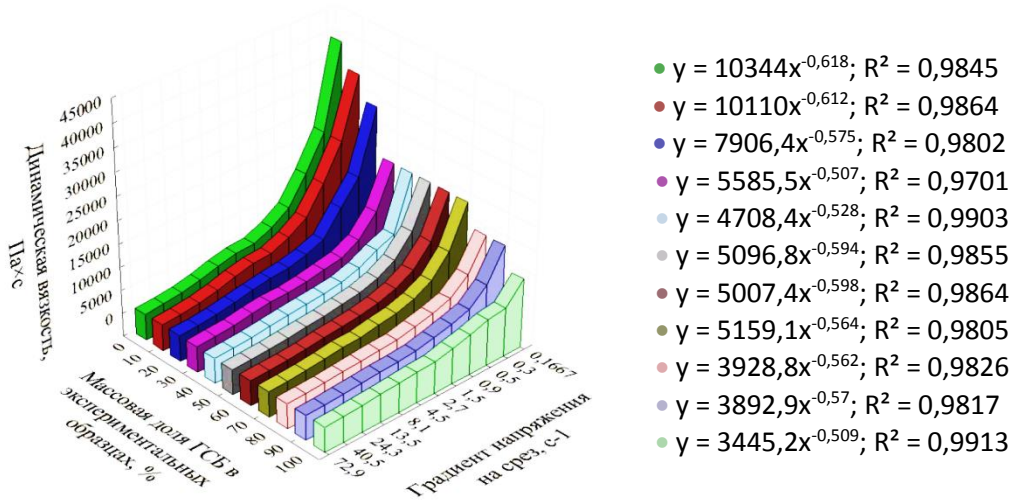


Рисунок 9 – Структурно-механические характеристики творожных продуктов с различным содержанием ГСБ

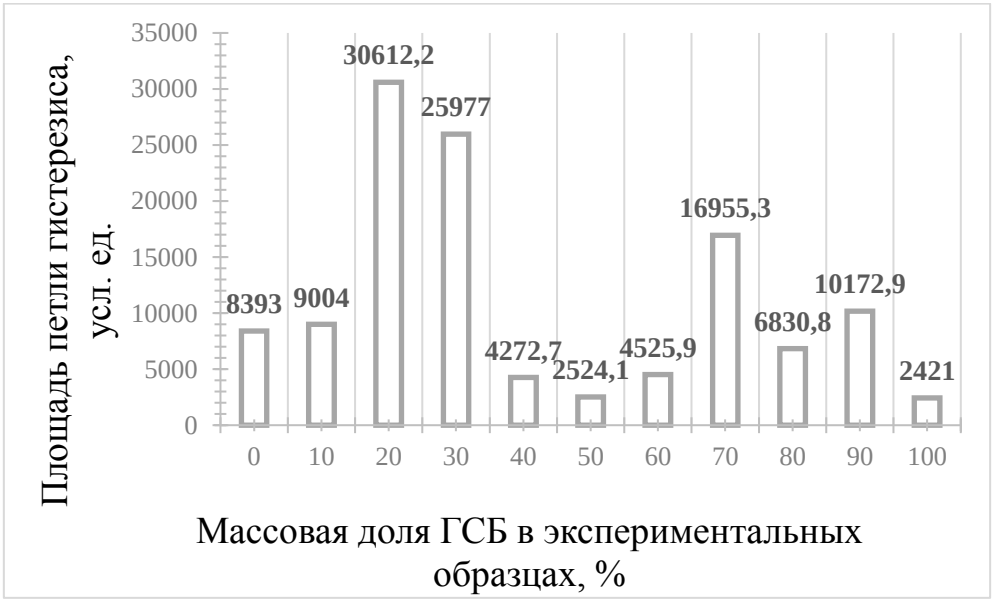


Рисунок 10 – Тиксотропные свойства творожных продуктов с различным содержанием ГСБ

При анализе тиксотропных свойств творожных продуктов с ГСБ (рис.10) выявлены наиболее высокие тиксотропные показатели у образцов с содержанием ГСБ 40 – 60 %, что говорит о стабильности полученных

эмульсионных систем по сравнению с контрольным образцом и по отношению к остальным творожным продуктам с различным содержанием ГСБ. Наихудшими тиксотропными свойствами обладали образцы с процентным содержанием ГСБ в диапазонах 20 – 30 %, 70 – 90 %.

В результате анализа полученной совокупности экспериментальных данных, было принято решение продолжить разработку двух видов творожного продукта на основе образцов с содержанием 50 % КСБ (образец №5) и 40 % ГСБ (образец №14).

3.4 Разработка технологии творожного продукта, обогащенного гидролизатом белков творожной сыворотки

Ориентируясь на поставленную цель разработки технологии творожного продукта с «аддитивным белком» творожной сыворотки, полученным за счет ее биокаталитической конверсии ферментным препаратом отечественного производства, предложена технологическая схема творожного продукта, в котором гидролизат сывороточных белков выполняет функции структурообразователя, замены части жирового компонента и источника биологически активных пептидов.

Приготовление образцов продуктов осуществляли по разработанной рецептуре (табл. 2) в следующей последовательности: составление смеси основных компонентов; внесение стабилизационной системы; диспергирование (с использованием измельчителя-диспергатора ГИД-100/1); пастеризация; охлаждение, аэрирование, фасование.

Таблица 2 Рецептура творожного продукта с использованием ГСБ, кг/1кг

Наименование компонента	Количество, кг
Творог	0,439
Сливки	0,270
Масло сливочное	0,080
Гидролизат белков творожной сыворотки	0,180
Стабилизационная система	0,036
ИТОГО	1,000

По результатам комплексных исследований разработана принципиальная технологическая схема получения эмульсионного аэрированного продукта с ГСБ, представленная на рисунке 11.

Обоснованы и установлены наиболее рациональные технологические режимы с учетом использования в рецептуре гидролизата, а именно: диспергирование при температуре 40 ºС с частотой вращения ротора 800 об/мин в течение 5 минут; тепловая обработка при 80 ºС и выдержка 5 мин; продолжительность газонаполения 5 мин при частоте вращения ротора 1200 об/мин и температуре 16 ºС. При указанных параметрах получаемый продукт имеет высокие сенсорные показатели, пенообразующие характеристики и прогнозируемую стойкость в хранении.

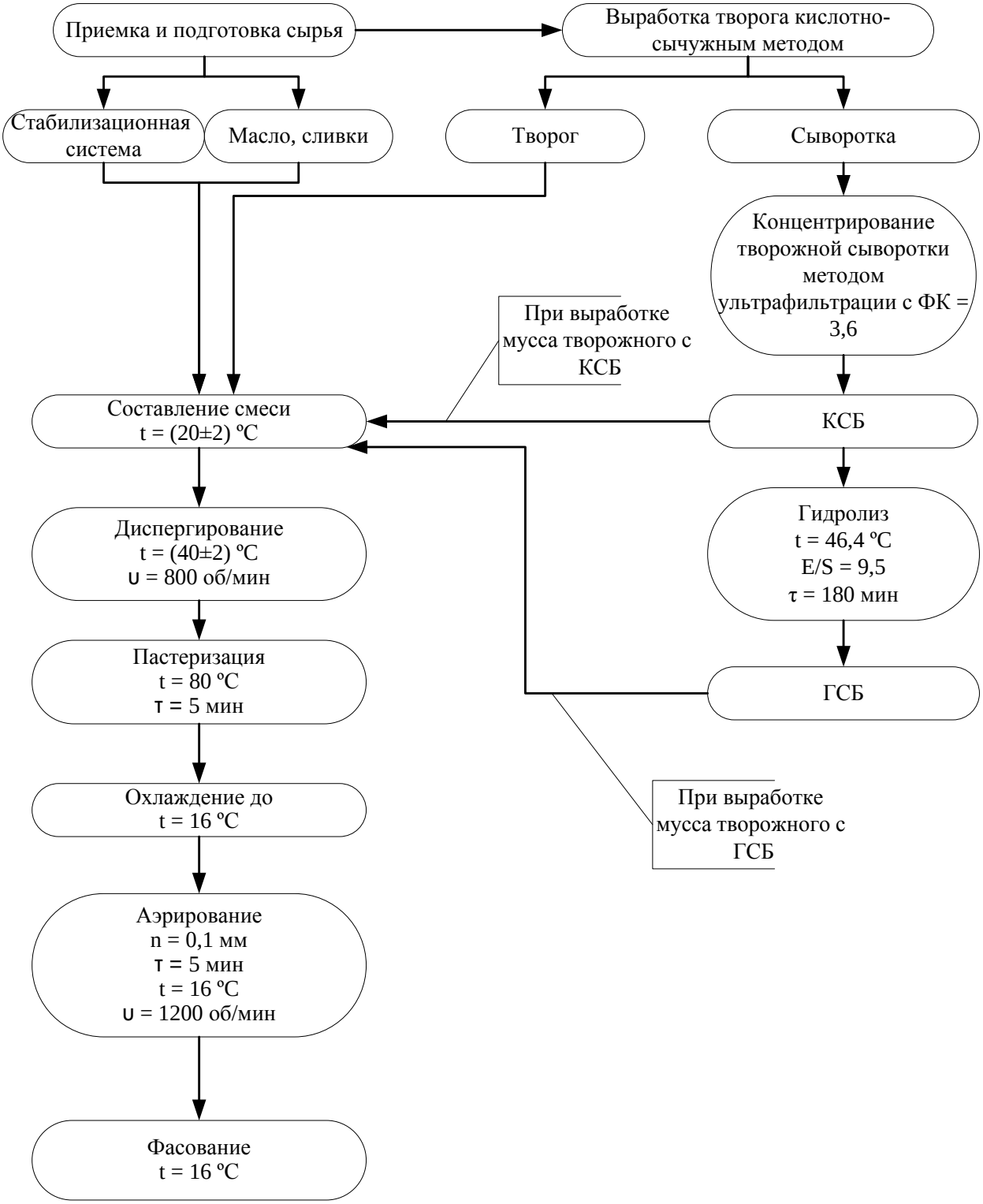


Рисунок 11 – Принципиальная технологическая схема получения творожного аэрированного продукта с ГСБ

3.5 Комплексное исследование свойств творожного продукта

С целью исследования свойств разработанного продукта, проведена его экспериментальная выработка по разработанной технологии. Полученным образцам присвоены условные обозначения:

-Тв-К -образец творожного продукта, выработанного по разработанной рецептуре без ГСБ (контроль);

-Тв-ГСБ40 -образец творожного продукта с массовой долей ГСБ 40%.

В табл.3 и на рис. 12,13 представлены результаты исследований.

Таблица 3-Биологическая и энергетическая ценность творожных продуктов

Условное обозначение образца	Содержание, г/100 г.			Энергетическая ценность, кКал
	Белок	Жир	Углеводы	
Тв-К	9,82	14,64	6,51	197,1
ТвГСБ40	9,95	12,89	6,03	179,9

По результатам испытаний образцов можно заключить, что введение в рецептуру творожного продукта 40 % гидролизата сывороточных белков позволяет снизить его энергетическую ценность в среднем на 10 %. При этом происходит увеличение массовой доли белка на 1,5 %, снижение массовой доли жира на 15 % и снижение массовой доли углеводов на 8 %.

Исследование аминокислотного состава (рис.11) экспериментальных образцов творожных продуктов в сравнении с идеальным белком по ФАО/ВОЗ показало, что полученные образцы содержат все незаменимые аминокислоты в достаточном количестве. При расчете аминокислотного скора выявлено, что лимитирующей аминокислотой всех образов является метионин+цистин (СКОР=0,884).

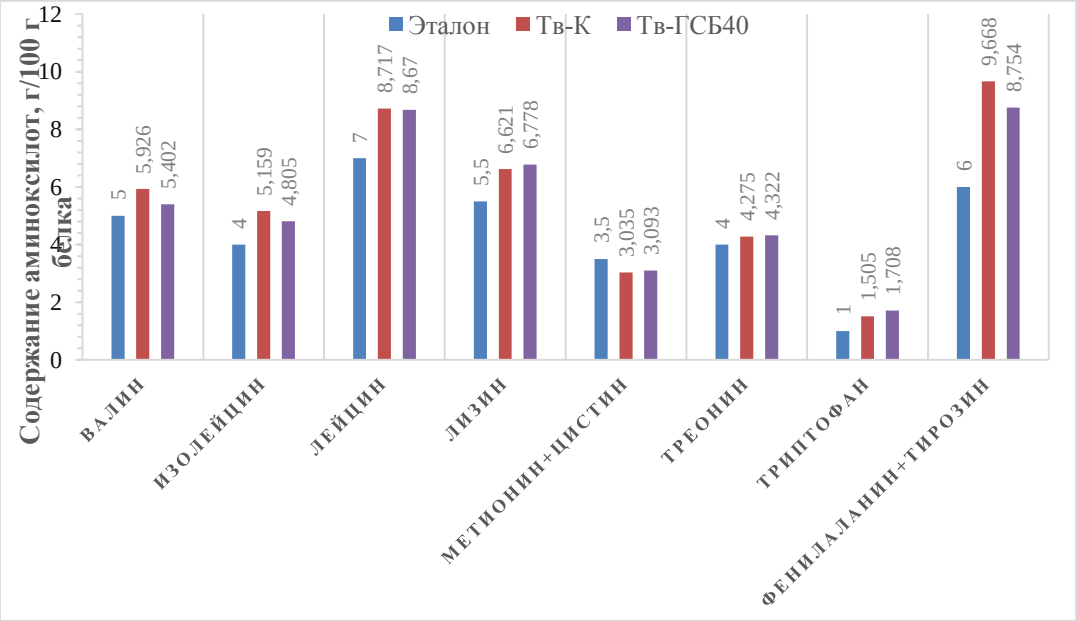


Рисунок 12 – Аминокислотный состав экспериментальных образцов творожных продуктов

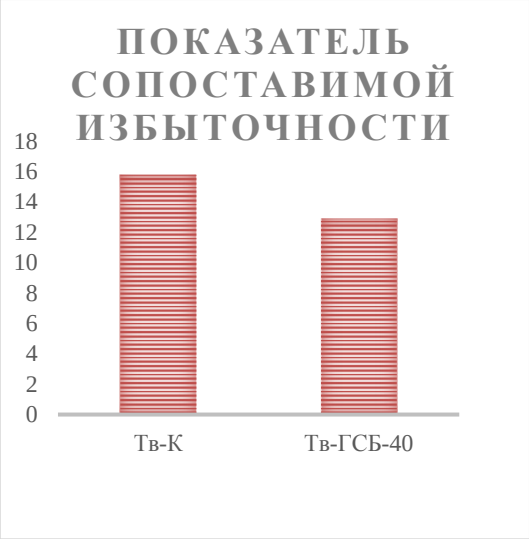


Рисунок 13 -Коэффициент утилитарности и показатель сопоставимой избыточности аминокислот полученных экспериментальных образцов

Стоит отметить, что введение белков творожной сыворотки в рецептуру продукта позволило незначительно увеличить коэффициент утилитарности и снизить показатель сопоставимой избыточности (рис.12). При этом модификация сывороточных белков при помощи ферментативного гидролиза позволяет увеличить коэффициент утилитарности, позволяя добиться лучшей усвояемости пептидов, содержащихся в продукте. Это может являться подтверждением целесообразности использования разработанного продукта с «аддитивным белком» в качестве элементов профилактического питания.

С целью установления рекомендованных сроков годности разработанного продукта был составлен график контроля показателей его качества и безопасности. Экспериментальный образец творожного продукта, выработанный с внесением в рецептуру ГСБ, закладывали на хранение в холодильную камеру при температуре (4±2) ˚С и относительной влажности 80-85%. В соответствии с разработанным графиком отбирали пробы на исследования. Результаты представлены в табл.4.

При органолептической оценке творожного продукта не выявлено изменений в процессе всего срока хранения. Вкус и запах продукта оставался насыщенным кисломолочным с оттенками сладко-сливочного, без посторонних привкусов и запахов. Консистенция оставалась плотной. Структура образца в процессе всего срока хранения не расслаивалась и оставалась гомогенной. Степень синерезиса на конец срока хранения составила 7%. Такая стабильность структуры образца, возможно, обусловлена тем, что гидролизованные пептидные композиции обладают повышенной влагоудерживающей способностью.

Микрофлора, вызывающая порчу продуктов, на протяжении всего срока хранения не обнаружена.

Таблица 4 - Показатели качества и безопасности экспериментального творожного продукта Тв-ГСБ40 в процессе хранения

Контролируемые показатели	Периодичность контроля, сутки					
	0 (фон)	3	5	7	10	15
Органолептические показатели	Соответствуют и не изменяются					
Массовая доля жира, %	12,90	-	-	-	-	12,85
Массовая доля белка, %	9,95	-	-	-	-	9,93
Титруемая кислотность, °Т	96	96	98	100	100	101
Степень синерезиса, %	0	0	0	2	4	7
БГКП в 0,01 г; БГКП в 0,1 г; БГКП в 1 г; Дрожжи в 1 г; Плесени в 1 г – Не обнаружены						

В процессе хранения были исследованы структурно-механические характеристики экспериментального образца творожного продукта. Анализ кривых течения показал, что зависимость вязкости творожного продукта с гидролизатом белков творожной сыворотки от скорости сдвига в процессе хранения носит степенной характер. В процессе хранения показатели динамической вязкости при увеличении градиента напряжения на срез имели стабильные показатели. Снижение начальной вязкости происходило незначительно. К концу срока хранения начальная вязкость экспериментального образца снизилась на 20 %.

На основании проанализированного комплекса данных рекомендован срок годности разработанного творожного продукта с гидролизатом сывороточных белков, который составил 11 суток.

3.6 Разработка технической документации на производство творожного продукта

Полученные результаты исследований позволили разработать техническую документацию ТУ 10.51.56-060-00419785-219 «Мусс творожный» на аэрированный творожный продукт с «аддитивным белком» творожной сыворотки, полученным за счет ее биокаталитической конверсии ферментным препаратом продуцента *Aspergillus oryzae*.

Разработанные технические условия распространяются на мусс творожный, вырабатываемый путем составления смеси творога, молочных продуктов и пищевых добавок с внесением гидролизата белков творожной сыворотки, с последующим диспергированием, пастеризацией, охлаждением, аэрированием и фасованием готового продукта.

Продукт предназначен для непосредственного употребления в пищу.

Основные результаты и выводы

1. Теоретически обоснована целесообразность использования творожной сыворотки в качестве сырья с точки зрения наиболее полного извлечения биологически ценных белков с использованием ферментативного гидролиза.
2. Проведена сравнительная оценка ферментных препаратов (кислых протеаз), продуцентов Aspergillus oryzae и Aspergillus niger. По совокупности результатов проведенных исследований (определение степени гидролиза, наличия горечи при органолептической оценке) ферментный препарат продуцента Aspergillus oryzae признан наиболее перспективным для целенаправленного гидролиза творожной сыворотки. Получены оптимальные условия гидролиза белков творожной сыворотки: температура процесса 46,4 %; продолжительность 180 мин, доза вносимого ФП 9,5 %; антиоксидантная емкость при этом составила 7,5 ТЭ ммоль/л при степени гидролиза 17,96 %.
3. Показано, что в полученном гидролизате белков творожной сыворотки заметно снизилось (примерно в 2 раза) содержание высокомолекулярных пептидных композиций по отношению к УФ- концентрату. При этом содержание пептидов с молекулярной массой 3,5 — 5 кДа увеличилось почти в 10 раз., содержание компонентов с молекулярной массой менее 3,5 кДа около 1,5 раза. Полученные результаты корреспондируются с литературными источниками о функциональности пептидов средней длины (3-10 кДа), что является подтверждением, что выбранные условия позволяют провести направленный биокатализ белков творожной сыворотки с получением гидролизата с заданными свойствами.
4. Исследовано влияние разработанного состава творожных продуктов с гидролизатом и концентратом творожной сыворотки на комплекс показателей и стабильность их структуры. Установлено, что максимальный прирост титруемой кислотности составляет при массовой доле 100% в продукте КСБ -16 ºТ; ГСБ - 24 ºТ. Получены экспериментальные данные о положительном влиянии ГСБ на микробиологические показатели, что, гипотетически, обусловлено наличием антимикробных пептидов, ингибирующих рост патогенной микрофлоры. Выявлены наиболее высокие тиксотропные показатели у образцов с содержанием ГСБ 40 – 60 %, что говорит о стабильности полученных эмульсионных систем по сравнению с контролем.
5. Установлено, что введение в рецептуру творожного продукта 40 % гидролизата сывороточных белков позволяет снизить его энергетическую ценность в среднем на 10 %. При этом происходит увеличение массовой доли белка на 1,5 %, снижение массовой доли жира на 15 % и снижение массовой доли углеводов на 8 %. Исследование аминокислотного состава экспериментальных образцов творожных продуктов в сравнении с идеальным белком по ФАО/ВОЗ показало, что полученные образцы содержат все незаменимые аминокислоты в достаточном количестве. При расчете аминокислотного скора выявлено, что лимитирующей аминокислотой всех образов является метионин+цистин (СКОР=0,884)

6. На основании проведенных комплексных исследований определены рациональные технологические параметры производства: диспергирование при температуре 40 ºС с частотой вращения ротора 800 об/мин в течение 5 минут; тепловая обработка при 80 ºС и выдержка 5 мин; продолжительность газонаполнения 5 мин при частоте вращения ротора 1200 об/мин и температуре 16 ºС. Разработана технология аэрированного творожного продукта с «аддитивным белком» творожной сыворотки, полученным за счет ее биокаталитической конверсии ферментным препаратом продуцента *Aspergillus oryzae*. Обоснован и рекомендован его срок годности 11 сут. при температуре (4±2)°С. Разработаны технические условия ТУ 10.51.56-060-00419785-219 «Мусс творожный»

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. **Золотарёв Н.А**. Использование гидролизатов творожной сыворотки при создании творожных эмульсионных продуктов/ Н. А. Золотарёв, О. Б. Федотова, Е. Ю. Агаркова // Молочная промышленность. - №.8 - 2017. - С.36-38
2. **Золотарёв Н. А.** Аэрированный творожный эмульсионный продукт с гидролизатом сывороточных белков / Н. А. Золотарёв, О. Б. Федотова, Е. Ю. Агаркова // Молочная промышленность. - № 8. -2018. – С. 52-54.
3. Agarkova E.Yu. Processing cottage cheese whey components for functional food production / E.Yu. Agarkova, A.G. Kruchinin, **N.A. Zolotaryov**, N.S. Pryanichnikova, Z.Yu. Belyakova, T.V. Fedorova // Foods and Raw Materials – 2020, Vol. 8, No. 1, Pp. 52–59.

Статьи в сборниках научных трудов, материалах российских и международных конференций

4. **Золотарёв Н. А**. Использование пробиотических культур р. Propionibacterium и lactobacillus acidophilus при получении творожного сгустка /Н. А. Золотарёв, Е. Ю. Агаркова, К. А. Березкина, А. Г. Кручинин// пищевые инновации и биотехнологии: мат. Межд. Науч. Конф. под общ. Ред. А. Ю. Просекова; ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности». – Кемерово, 2014. – т. 1. – С. 85 – 87.
5. **Золотарёв Н. А**. Создание основы эмульсионного продукта с функциональными свойствами / Н. А. Золотарёв, Е. Ю. Агаркова, К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин // Научное обеспечение молочной промышленности (микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности). Сборник научных трудов. М.: ФГБНУ «ВНИМИ», Издательство «Франтера». – 2015. – С. 60 – 64.
6. **Золотарёв Н. А**. Исследование эффективности гидролиза белков творожной сыворотки кислыми протеазами / Н. А. Золотарёв // Научное обеспечение молочной промышленности (микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности). Сборник научных трудов. М.: ФГБНУ «ВНИМИ», Издательство «Франтера». – 2015. – С. 64 – 68.

7. **Золотарёв Н. А.** Перспективность гидролиза белков творожной сыворотки кислыми протеазами / Н. А. Золотарёв, О. Б. Федотова // Техника и технология пищевых производств: тез. докл. X Междунар. науч. конф. Студентов и аспирантов, 28-29 апреля 2016 г., Могилев / Учреждение образования «Могилевский государственный университет продовольствия»; редкол.: А. В. Акулич (отв. ред.) [и др.]. – Могилев: МГУП, 2016. – С. – 199.
8. **Золотарёв Н. А.** Творожная сыворотка как перспективное сырье для получения гидролизованных пептидных композиций /Н. А. Золотарёв // Пища. Экология. Качество: труды XIII Междунар. науч.-практ. конф.(Красноярск, 18-19 марта 2016 г.) ФАНО России, Минобрнауки РФ, Сиб. науч.-исслед. и технол. ин-т перераб. с.-х. продукции, ФГБОУ Красноярский ГАУ, СФНЦА РАН (отв. за вып.: Мотовилов О. К., Пыжикова Н. И. и др.]. – Новосибирск, 2016. – т. 1. – С. 442 – 445.
9. **Золотарёв Н. А**. Проблемы и перспективы переработки вторичного сырья молочной промышленности / Н. А. Золотарёв // Научное обеспечение молочной промышленности (микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности, стандартизация). Сборник научных трудов. М.: ФГБНУ «ВНИМИ», Издательство «Франтера». -2016.-С.101-105.
10. **Золотарёв Н.А.** Ферментативный гидролиз белков творожной сыворотки с последующей оценкой свойств полученных гидролизатов / Н. А. Золотарёв, О. Б. Федотова, Д. Н. Мельденберг // III Международная научно-техническая конференция (заочная) «Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство» [Электронный ресурс]: сборник материалов, 8 ноября 2016 г. / Воронеж. гос. ун-т инж. технол., ВГУИТ, 2016. с.507-514
11. Агаркова Е. Ю. Совершенствование технологии сывороточных гидролизатов/ Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева, **Н. А. Золотарёв** // Техника и технология пищевых производств: тезисы докладов XI Международной научн.-техн. конференции, 20-21 апреля 2017 г., Могилев / Учреждение образования «Могилевский государственный университет продовольствия»; редкол.: А. В. Акулич (отв. ред.) [и др.]. – Могилев: МГУП, 2017. – С. – 202.
12. Рязанцева К. А. Создание функционального творожного мусса, обогащенного биологически активными гидролизатами сывороточных белков молока / К. А. Рязанцева, Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, **Н. А. Золотарёв,** Т. В. Федорова // Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи: мат. Всероссийской конф. молодых ученых с междунар. участием, 12-13 октября 2017 г., Москва / ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 2017. – т. 1. – С. 217 – 220.
13. **Золотарёв Н. А.** Перспективы использования ферментативного гидролиза для увеличения хранимоспособности аэрированных творожных продуктов/ Н. А. Золотарёв // Пищевые системы: теория, методология, практика. Сборник научных трудов XI Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук / ВНИХИ – филиал

ФГБНУ «ФИЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН. – М.: - ВНИХИ – филиал ФГБНУ «ФИЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова», 2017. – С. 115 – 123.

14. **Золотарёв Н. А.** Функциональные продукты, получаемые с использованием модификации молочных белков / Н. А. Золотарёв// V Международная научно-техническая конференция «Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство» [Электронный ресурс]: сборник материалов, 16 ноября 2018 г. / Воронеж. гос. ун-т инж. технол., ВГУИТ, 2018. – С. 471 – 481.
15. **Золотарёв Н. А.** Применение кислых протеаз в разработке функциональных молочных продуктов / Н. А. Золотарёв, Е. Ю. Агаркова // Техника и технология пищевых производств: тезисы докладов XI Междунар. науч. конф. студентов и аспирантов, 18-19 апреля 2019 г., Могилев / Учреждение образования «Могилевский государственный университет продовольствия»; редкол. А. В. Акулич (отв. ред.) [и др.]. – Могилев: МГУП, 2019. – С. 169.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБТС – 2,2'-азинобис-(3-этил-бензотиазолинсульфонат)
АПК – агропромышленный комплекс
АПФ – ангиотензинпревращающий фермент
БАВ – биологически активные вещества
БГКП – бактерии группы кишечных палочек
БИКОДО – бифидогенные кормовые добавки
БТС – биотехнологическая система
ВЭЖХ-высокоэффективная жидкостная хроматография
ГСБ – гидролизат сывороточных белков
ГОС – галактосахариды
ДЭФ – двумерный электрофорез
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИСБ – изолят сывороточных белков
КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных
КМБ – концентрат молочных белков
КСБ – концентрат сывороточных белков
КСБУ – концентрат сыворотки белково-углеводный
КСБ-УФ – концентрат сывороточных белков ультрафильтрационный
ОП – оптическая плотность
РФЭ – рулонный фильтрующий элемент
СГ – степень гидролиза
ТЖС – технология живых систем
ТЭ – тролокс эксвивалент
УФ – ультрафильтрация
ФГМБ – функциональный гидролизат молочных белков
ФП – ферментный препарат
DH – степень гидролиза
TEAC – антиоксидантная активность