ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ (ФГАНУ «ВНИМИ»)

На правах рукописи

Золотарёв Никита Александрович

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ТВОРОЖНОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ ТВОРОЖНОЙ СЫВОРОТКИ

Специальность 05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель: Доктор технических наук,
старший научный сотрудник
О.Б. Федотова

Москва 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ..... 3
1 АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ..... 8
1.1 Современные способы глубокой переработки молочной сыворотки..... 8
1.2 Функциональные продукты, получаемые с использованием модификации молочных белков..... 32
1.3 Ферментные препараты для получения гидролизатов творожной сыворотки..... 39
2 ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ..... 49
2.1 Организация проведения исследований..... 49
2.2 Объекты исследований..... 50
2.3 Методы исследования..... 50
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... 64
3.1 Сравнительная оценка ферментных препаратов и оценка эффективности их действия..... 64
3.2 Оптимизация условий ферментативного гидролиза..... 74
3.3 Оценка свойств гидролизата, полученного при оптимальных условиях процесса гидролиза..... 84
3.4 Разработка технологии творожного продукта, обогащенного гидролизатом белков творожной сыворотки..... 89
3.5 Комплексное исследование свойств творожного продукта..... 111
3.6 Разработка технической документации на производство творожного продукта..... 117
Основные результаты и выводы..... 120
Список использованной литературы..... 122
Перечень сокращений и условных обозначений..... 148
Приложения..... 149

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 разработанного 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 с «аддитивным белком» творожной сыворотки.

Теоретическая и практическая значимость

Создание нового продукта 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 использованием 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.

1 АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ

1.1 Современные способы глубокой переработки молочной сыворотки

В трудах Храмцова А. Г. в ключе рассмотрения науки о молоке – лактоомики – отмечено, что молоко еще в начале XVII века делили на три компонента: Butirum (жир); Caseus (белок) и Serum (сыворотка). На современном же этапе, как отмечено в работе автора, молоко и все молочное сырье (сливки, обезжиренное молоко, пахта, молочная сыворотка, и безказеиновая фаза) являются сложнейшей, синтезированной и возобновляемой природой особо ценной биотехнологической системой (БТС) [135, 137, 179]. Таким образом, по утверждению Храмцова А. Г., имея информацию о составе, размерах и свойствах молочного сырья, все его компоненты следует рассматривать в качестве природных кластеров – липидного (жир), азотсодержащего (белки), углеводного (лактоза), минерального (соли), БАВ и воды. Опираясь на мнение автора, молоко является моделью для направленного и управляемого создания продуктов функционального питания для детерминированных групп населения, кормовых средств, медпрепаратов и технических полуфабрикатов (биочипы) нового поколения [137, 140].

Как утверждает Храмцов А. Г. и Пономарев А. Н. с соавторами из Воронежского Государственного Университета Инженерных Технологий, в процессе биоэнергетического воздействия на молоко как сложную полидисперсную систему при получении творога и сыров все соединения (кластеры) подвергаются направленной конформации для получения желаемых продуктов, одним из ткоторых является молочная сыворотка. [101, 140].

Проблема использования молочной сыворотки, по мнению Евдокимова И. А. с соавторами, возникла еще на заре промышленного освоения технологий таких высокобелковых молочных продуктов, как сыр, творог и казеин, при производстве которых не более 20% массы молока переходит в основной продукт, в то время как 80-88% приходится на молочную сыворотку [52].

В работе Володина Д. Н. отмечено, что популярность сыров и творога у потребителей по-прежнему остается на достаточно высоком уровне, несмотря на

то, что в 2016 г. наблюдались некоторый рост цен и тенденция снижения темпов наращивания объемов производства этих продуктов по сравнению с показателями 2015 г. Как показывают данные статистики (Росстат), производство сыров в 2016 г. показало рост лишь на 1,9 % (произведено 350,6 тыс. т) по отношению к 2015 г; производство творога снизилось на 1,5 % (582,4 тыс. т) в сравнении с 2015 г [13].

Тем не менее, ученые Володин Д. Н., Евдокимов И. А. и Pais Chanfrau JM утверждают, что при незначительном снижении объемов производства основных продуктов, ресурсы невостребованной сыворотки остаются огромными. И не смотря на ее высокую питательную и биологическую ценность, глубокая переработка молочной сыворотки сдерживается по нескольким причинам. Среди них, отмечают авторы, можно выделить незначительные инвестиции в молочную промышленность, отсутствие средств на внедрение современных технологий и покупку оборудования, недостаточные информация о преимуществах продуктов из сыворотки и реклама здорового образа жизни, отсутствие массового производства многофункциональных продуктов на основе молочной сыворотки, либерализм экологической службы в отношении сброса сыворотки в сточные воды. В зависимости от объемов и вида молочной сыворотки должны применяться различные технологии ее переработки. По данным ММФ, объемы сыворотки в мире составляют более 180 млн т. (только 60% подвергается промышленной переработке) и проблема сыворотки во многих странах остается актуальной [13, 46, 188].

Молочная сыворотка всех видов (подсырная и творожная, жирная и нежирная) по утверждению Храмцова А. Г. – возобновляемое природное (экологически чистое) биологическое (живое) сырье животного происхождения (БИОЭКОСЫРЬЕ) [142]. Автор отмечает, что в ней содержится 50% сухих веществ молока, в том числе 30% беков, идентифицировано более 250 различных соединений, в их числе тонкодиспергированный молочный жир, растворимые азотистые соединения и минеральные соли, лактоза, витамины, ферменты, органические кислоты (таблица 1.1 [142]), поэтому она обладает высокой пищевой и биологической ценностью [138]. Степень перехода основных

компонентов молока во вторичное молочное сырье, в том числе и сыворотку, показана в таблице 1.2 [133].

Таблица 1.1 – Содержание идентифицированных соединений в молочной сыворотке в сравнении с молоком [142]

Компоненты	Содержание в 100 г продукта		Степень перехода, %
	сыворотка	молоко	
Сухое вещество, г	6,34	12,7	52,83
Белки, г	0,89	3,2	27,81
В том числе:			
Казеин	0,29	2,6	11,15
сывороточные белки	0,36	0,6	60,00
Из них:			
ангиогенин, мг/г	0,5-1,2	2,3	21,74-52,17
лактоферрин, мг/мл	0,08	0,1	80,00
Жиры, г	0,36	3,6	60,00
В том числе:			
триглицериды	0,35	3,5	10,00
фосфолипиды	0,003	0,03	10,00
холестерин	0,001	0,01	10,00
Углеводы, г	4,55	4,8	94,80
Органические кислоты, г:			
лимонная	0,016	0,16	10,00
Минеральные вещества (зола), г	0,7	0,7	100
Аминокислоты, мг	873	3144	27,77
Незаменимые аминокислоты, мг	384	1385	27,73
Заменимые аминокислоты, мг	448	1759	25,47
Макроэлементы, мг:			
кальций	84	120	70,00
Калий	102	146	69,86
Магний	10	14	71,43
Натрий	5	50	10,00
Фосфор	3	90	3,33
Сера	2	29	6,90
Хлор	77	110	70,00
Микроэлементы, мкг:			
алюминий	35	50	70,00
Барий	7,4	10,5	70,48
Бор	21	30	70,00
Бром	14	20	70,00

Продолжение таблицы

ванадий	10,8	15,4	70,13
Железо	47	67	70,15
Йод	6,3	9	70,00
Кадмий	1,3	1,8	72,22
Кобальт	0,6	0,8	75,00
кремний	14,3	20,4	70,10
Литий	13	19	68,42
марганец	4	6	66,67
Медь	8	12	66,67
молибден	3,5	5	70,00
Никель	2	2,8	71,43
Селен	1,4	2	70,00
Серебро	2,4	3,5	68,57
стронций	12	17	70,59
Сурьма	1,75	2,5	70,00
Фтор	14	20	70,00
Хром	1,4	2	70,00
Цинк	280	400	70,00
Витамины, мг:			
A	0,003	0,03	10,00
E	0,03	0,09	33,33
C	1,17	1,5	78,00
B_6	0,07	0,05	140,0
B_{12}, мкг	0,23	0,4	57,50
B_2	0,14	0,15	93,33
B_1	0,035	0,04	87,50
PP	0,05	0,1	50,00
Витаминоподобные вещества, мг:			
Холин	24	23,6	101,70
L-карнитин, мг/100 мл	30-50	30-50	100,00
остеопатин	Следы	Следы	-
Вода, г	93,66	87,3	107,28

Но наряду с питательной ценностью, по утверждению Храмцова А. Г., молочная сыворотка и продукты, получаемые из нее, имеют диетическое и даже лечебное значение. Данные о функциональности молочной сыворотки представлены в таблице 1.2 [132, 138].

Таблица 1.2 – Степень перехода основных компонентов молока во вторичное молочное сырье, % [133].

Компоненты молока	Степень перехода, %		
	Обезжиренное молоко	Пахта	Молочная сыворотка
Молочный жир	1,4	14,0	5,5
Белок, всего	99,6	99,4	24,3
Казеин	99,5	99,5	22,5
Сывороточные белки	99,8	99,6	95,0
Лактоза	99,5	99,4	96,0
Минеральные соли	99,8	99,6	98,0
Сухое вещество	70,4	72,8	52,0

Как уже было сказано ранее, по мнению Храмцова А. Г., молочную сыворотку, имеющей в своем составе большую часть соединений молока, также следует рассматривать с позиции БТС. Всего, по примерным расчетам (исходя из ассортимента сыров, творога и казеинов), в мире насчитывается более 15 000 видов молочной сыворотки. В нашей стране, видимо, речь идет о тысячах видов. На практике дело имеют обычно с двумя категориями молочной сыворотки – сладкой и кислой. Они являются побочными продуктами сыроделия (сладкая сыворотка) или производства творога и казеина (кислая сыворотка) [141, 142].

Таблица 1.3 – Показатели функциональности молочной сыворотки [133]

Физиологически функциональный пищевой ингредиент	Рекомендуемая норма потребления, мг/сутки	Удовлетворение суточной потребности при употреблении 100 мл сыворотки, %	
		Подсырной	Творожной
Белки	85000	1,3	1,7
Лактоза	18000	27,2	28,3
Кальций	1000	7	12,0
Фосфор	800	6,5	8,0
Калий	2500	7,2	11,2
Натрий	1300	6,9	5,8
Медь	3,0	90,0	0,1
Цинк	12,0	95,8	4,2
Железо	18,0	35,0	0,3
Марганец	5,0	104,0	-
B_1 (тиамин)	1,5	2,7	20,0
B_2 (рибофлавин)	1,8	ИД	55,6
Ниацин	20,0	3,0	50,0
С (аскорбиновая кислота)	90,0	1,7	4,4

На первый взгляд, по мнению Володина Д. Н., состав творожной сыворотки идентичен составу подсырной, различаются в основном массовые доли лактозы и кислоты (таблица 1.4). На практике, заявляет автор, состав и свойства молочной сыворотки колеблются в широком диапазоне, что определяется составом, технологическими особенностями производства сыра и творога, а также другими факторами [13, 19, 138].

Таблица 1.4 – Характеристики молочной сыворотки (физико-химические) [13, 19, 138]

Характеристика	Значение характеристики для сыворотки	
	Подсырной	Творожной
сухие вещества,%	от 4,5 до 7,2	от 4,2 до 7,4
Из них: Лактоза	от 3,9 до 4,9	от 3,2 до 5,1
Белок	от 0,5 до 1,1	от 0,5 до 1,4
Минеральные вещества	от 0,3 до 0,8	от 0,5 до 0,8
Жир	от 0,05 до 0,5	от 0,05 до 0,4
Молочная кислота	0,18	0,65
Активная кислотность, не менее	5,9	4,2
Титруемая кислотность,°Т	от 15 до 25	от 50 до 85
Плотность, кг/м^3	от 1018 до1027	от 1019 до 1026

В книге Залашко М. В. отмечено, что основной компонент сухих веществ сыворотки представлен уникальным дисахаридом животного происхождения – лактозой (70 %). Сладость ее в 6,25 раз меньше, чем сахарозы и в 4,6 раза – чем глюкозы. Характерным свойством лактозы является ее медленное расщепление в организме, что имеет немаловажное значение для постепенного снабжения его энергией. В отличие от глюкозы, поясняет автор, лактоза не «сгорает» мгновенно, а медленно «тлеет» и поддерживает тепло на одном уровне [56]. Помимо этого, в работах Гаврилова Г. Б. и Пономарева А. Н. сказано, что лактоза в процессе медленного гидролиза достигает отдел толстого кишечника, и стимулирует жизнедеятельность бактерий. Эти бактерии продуцируют молочную кислоту, которая подавляет жизнедеятельность гнилостной микрофлоры и способствует усвоению фосфора и кальция. Продукты гидролиза лактозы (D-глюкоза и D-галактоза), получаемые под действием фермента слизистой кишечника β-галактозидазы, участвуют в синтезе резервного углевода гликогена и образовании

ганглиозидов мозга. Кроме того, лактоза способна сорбировать ароматические вещества, что позволяет стабилизировать вкус и аромат рецептурных композиций пищевых продуктов, приготовленных на основе сыворотки [19, 101].

Рябцева С. А., Дробот В. И. отмечают, что при изомеризации лактозы образуется лактулоза – дисахарид, состоящий из остатков галактозы и фруктозы и относящийся к наиболее перспективным бифидогенным факторам, способствующим формированию нормального кишечного микробиоценоза. Из-за отсутствия в организме человека ферментов β-гликозидаз, способных расщепить лактулозу в верхнем отделе желудочно-кишечного тракта, попадая в толстый кишечник, лактулоза используется бифидобактериями как источник энергии и углерода. В результате чего количество бифидобактерий резко увеличивается. При этом продукты их метаболизма - молочная, масляная, уксусная и другие жирные кислоты - накапливаются в толстом кишечнике, снижая кислотность среды и тем самым подавляя развития патогенной и протеолитической микрофлоры. В результате этого уменьшается образование токсичных продуктов белкового распада, предотвращается отравление организма, повышается сопротивляемость к различным заболеваниям. Таким образом, опираясь на работы ученых, лактулоза используется в продуктах детского, диетического и гериатрического питания, при лечении кишечных дисбактериозов и печеночной недостаточности. Кроме того, лактулоза в два раза слаще лактозы, не повышает уровня глюкозы в крови, что позволяет использовать ее в продуктах для людей, страдающих диабетом [44, 112, 151].

В статье Храмцова А. Г. сказано, что белковый комплекс молочной сыворотки, являющийся аналогом крови, исключительно разнообразен и постоянно пополняется [129]. Его фракции, исходя из работ Залашко М. В. и Charu Gupta, такие как β-лактоглобулин, α-лактальбумин, бычий сывороточный альбумин, лактоферрин, иммуноглобулины, лактопероксидаза, гликомакропептиды, являются одними из основных и наиболее ценных компонентов нутрицевтического потенциала[56, 160]. Кроме этого, как утверждает Komolova G. S., перечисленные пептиды сравнительно с недавнего

времени дополнены ангиогенином [177] («рождающий сосуды» [106]), L-карнитином и ангиогенином (в названии суть – наши суставы) [129].

В ряде работ высказано мнение о ценности сывороточных белков (табл. 1.5 [172, 176].), которая заключается в том, что они служат дополнительным источником дефицитных незаменимых аминокислот, таких как аргинин, гистидин, метионин, треонин, лизин, триптофан, лейцин. В совокупности пептидные фракции молочной сыворотки имеют все незаменимые аминокислоты и в более высоких концентрациях по сравнению с различными растительными белковыми источниками, такими как соя, кукуруза и пшеничный глютен. В дополнение к полному спектру аминокислот, по мнению авторов, аминокислоты, содержащиеся в сыворотке, эффективно всасываются и расщепляются по отношению к растворам свободных аминокислот. Биологическая ценность сывороточных белков очень высока и составляет примерно 112% по отношению к эталонному белку. [23, 66, 176].

В дополнение к сказанному, учеными Банниковой А. В. и Евдокимовым И. А. отмечено, что с точки зрения важности для синтеза белка в организме выделяют аминокислоты с разветвленной цепью (лейцин, изолейцин и валин), способные стимулировать синтез протеина. Сывороточный белок, по мнению авторов, обладает высокой степенью стимуляции протеина (68%, тогда как у казеина – 31%), содержит наибольшее количество лейцина, действующего на производство рибосом (место синтеза белка в клетке) и обладает высоким индексом усвояемости [9].

Таблица 1.5 – Содержание сывороточных белков в молочной сыворотке и их нутрицевтический потенциал [172, 176].

Сывороточный белок	Содержание, %	Нутрицевтический потенциал
β-лактоглобулин	50 – 55	Источник эссенциальных аминокислот и аминокислот с разветвленными боковыми цепями. Связывает жирорастворимые витамины, увеличивая биодоступность
α-лактоглобулин	20 – 25	Основной белок, содержащийся в грудном молоке; Источник эссенциальных аминокислот и аминокислот с

		разветвленными боковыми цепями. Высокий уровень содержания незаменимой аминокислоты триптофана, которая помогает регулировать сон, настроение, стресс
Иммуноглобулины	10 – 15	Первичный белок, содержащийся в молозиве; Иммуномодулирующие свойства
Сывороточный альбумин	5 – 10	Большой белок с хорошим профилем незаменимых аминокислот. Жиросвязующие свойства
Лактоферрин	1,0 – 2,0	Антиоксидантные, Антибактериальные, противовирусные и противогрибковые свойства. Способствует росту полезных бактерий. Регулирует всасывание железа и и его биодоступность. Естественно встречающийся в грудном молоке, слезах, слюне, желчи, крови.
Лактопероксидаза	0,5	Ингибирует рост бактерий
Гликомакропептиды	10 - 15	Источник аминокислот с разветвленной цепью Отсутствие ароматических аминокислот таких, как фенилаланин, триптофан и тирозин, поэтому часто используется в детском питании для детей с фенилкетонурией.

Кроме функциональности, отмечает Charu Gupta, сывороточные белки и их концентраты/изоляты обладают широким спектром ценных технологических свойств, которые проявляются в результате их применения в качестве пищевых ингредиентов (табл. 1.6 [159]). Автор предполагает, что они могут модифицировать некоторые или же все сенсорные, гидратационные, поверхностно-активные, структурные, текстурные и реологические свойства пищевых систем, что приводит к улучшению восприятия потребителем готового продукта [159]. Так, например, опираясь на работу Tage Affertsholt с соавторами, они проявляют жиро- и влагосвязывающие свойства, эмульгирующую способность, стабилизирующие и гелеобразующие свойства. Помимо всего прочего обладают отличной пенообразующей способностью (взбиваемостью) [196], а также, как описано в статье Володина Д. Н., вступают в реакции с

сахарами (реакция Майяра), что формирует характерный привкус и цвет некоторых продуктов кондитерского и хлебопекарного производства [14].

В статье Rullier B показано, что сывороточные белки стабилизируют пену, адсорбируясь на границе раздела воздух-вода, образуя вязкоупругие адсорбированные слои, что в свою очередь приводит к образованию белковой сети с высокой вязкостью [192]. Просеков А. Ю. считает, что благодаря своим пенообразующим свойствам сывороточные белки можно применять для производства аэрированных десертов, муссов, мороженого и т.п. [104]. Кроме того, Jeewanthi RK высказывает мнение о том, что молочные белки могут использоваться в качестве заменителей яиц для индуцирования и стабилизации пены в аэрированных пищевых продуктах, таких как безе и пирожных типа мадеры [171]. Van der Ven утверждает, что пенообразующие свойства лучше всего проявляются, когда сывороточные белки неденатурированы, не конкурируют с другими поверхностно-активными веществами на границе раздела воздух/вода и стабилизируются за счет увеличения вязкости при образовании пены. Такие пены, как считает автор проявляют высокую стабильность, а также эффект непробиваемости (можно продолжать взбивать пену из сывороточных белков после достижения максимального объема, не опасаясь ее «разбить») [199]. В то же время в работах Jeewanthi RK и Yoon Y. C. показано, что по сравнению с интактными сывороточными белками, белки, модифицированные путем применения ферментативного гидролиза способствует вспениванию и аэрации намного эффективнее за счет более быстрого поглощения на границе раздела фаз вследствие уменьшения размеров пептида до молекулярной массы 3-5 кДа [171, 203].

В статье Володина Д. Н. отмечено, что модифицированная форма концентрата сывороточных белков, называемая микропартикулированным сывороточным белком, применяется в молочной промышленности в качестве «имитатора жира» при производстве низкожирных продуктов, что способствует снижению калорийности, улучшению структуры и стабильности продуктов, формированию и усилению молочного вкуса и цвета [14]. К тому же, как

утверждает Шипулин В. И., использование сывороточных белков в мясной промышленности, при введении их в состав фаршей, приводит к повышению pH, что положительно сказывается на водосвязывающей способности. Кроме этого, по мнению автора, придается аромат, улучшается вкус конечных продуктов и их реологические характеристики [155].

Таблица 1.6 – Некоторые технологические свойства сывороточных белков в пищевых системах [159]

Технологическое свойство	Способ действия	Пищевая система
Растворимость	Растворение	Напитки
Влагосвязывающая способность	Связывание воды	Мясные и хлебобулочные изделия
Вязкость	Сгущение	Супы, соусы, йогурты, десерты, мороженое
Гелеобразование	Формирование структуры	Мясные и рыбные изделия
Эмульгирующая способность	Формирование эмульсий	Детское питание
Жиросвязывающие свойства	Связывание свободного жира	Сосиски
Пенообразующие свойства	Аэрирование	Взбитые молочные продукты
Придание аромата	Высвобождение аромата	Мясные, хлебобулочные и молочные изделия

Анализируя имеющуюся информацию за последние 10 – 15 лет, ученые и практики разных школ усиленно занимались вопросами промышленной переработки и реализацией становления феномена молочной сыворотки [4, 12, 51, 64, 103-105, 141, 198]. По мнению Храмцова А. Г. промышленная обработка молочной сыворотки – универсального сельскохозяйственного сырья – и рациональное использование полученной продукции являлось и является, в условиях рыночной экономики, важной, самостоятельной проблемой молочной отрасли пищевой индустрии АПК [134].

Следует учитывать, как отмечено Пономаревым А. Н., Золотаревой М. С, Храмцовым А. Г, что в условиях ограниченных ресурсов традиционного молока-сырья, целесообразность более полного, рационального использования молочной сыворотки в качестве альтернативного источника сырья не имеет аналогов. По мнению авторов организация альтернативных производств обоснована как с экономической, так и с экологической точек зрения. Первая связана с

расширением ресурсных возможностей за счет более глубокой комплексной переработки сырья и вовлечением неиспользованного возобновляемого материального ресурса для получения продуктов питания с диетическими, профилактическими и лечебными свойствами (в т. ч. лекарственных препаратов); вторая обусловлена актуальной проблемой, связанной с последствиями утилизации молочной сыворотки в окружающую среду [59, 101, 133].

В настоящее время концепция промышленной глубинной переработки и рационального использования ресурсов молочной сыворотки, по мнению Храмцова А. Г. и Евдокимова И. А., может быть реализована по трем направлениям: получение всех компонентов молочной сыворотки в комплексе; извлечение отдельных компонентов; синтез производных компонентов [134, 143]. Все три направления опираются непосредственно на разработанные многочисленные методы, процессы обработки и переработки сыворотки. Червецовым В. В., Яковлевой Т. А и Евдокимовым И. А. предложена классификация процессов переработки молочной сыворотки по химическим и физическим свойствам разделяемых компонентов (табл. 1.7) [154].

Получение комплекса компонентов молочной сыворотки

Данное направление включает технологически три ассортиментных группы: напитки, сгущенные и сухие концентраты [143].

Вопросы использования молочной сыворотки для получения напитков были рассмотрены Жидковым В. Е [54]. Как показано в работе Крусь Г. Н., в зависимости от вида напитков могут быть использованы центробежные методы обработки сыворотки для удаления жира, как нежелательного компонента многих напитков; кислотно-тепловые методы для осветления (удаления белков) при производстве прозрачных (осветленных) безалкогольных прохладительных напитков [69] и слабоалкогольных напитков; процессы ферментирования (биотехнологические методы) [54].

Таблица 1.7 – Классификация процессов переработки молочной сыворотки [154].

Методы обработки	Сущность метода	Достоинства	Недостатки
Коагуляция сывороточных белков	Для изменения нативного состояние белка (денатурации) применяют облучение, механическое воздействие, нагревание, изменение pH среды. Чаще всего используют последние два метода или их совокупность: введение в сыворотку реагентов-коагулянтов (соляную кислоту, кислую сыворотку, хлористый кальций и др.) способствует более полной тепловой денатурации	Доступность метода и простота аппаратурно-процессового оформления обусловливают его широкое применение	Нагревание молочной сыворотки ведет к частичной или полной денатурации белков, а также к реакциям между отдельными фракциями белков или между белками и другими составными частями сыворотки. При нагревании сыворотки на греющих поверхностях аппаратов образуется трудноудаляемый пригар. Действие реагентов-коагулянтов избирательно по отношению к разным видам сыворотки
Центрифугирование (сепарирование)	Разделение компонентов молочной сыворотки основано на разном поведении частиц в поле центробежных сил. Частицы, имеющие разную плотность, форму и размеры, осаждаются с разной скоростью. Используются для выделения из молочной сыворотки жира, казеиновой пыли, коагулированных сывороточных белков, отделения кристаллов молочного сахара, некоторых других технологических процессов	Использование сепаратора обеспечивает поточную обработку сыворотки без снижения ее качества с получением казеиновой пыли в виде белковой массы и молочного жира в виде подсырных сливок. Непрерывное получение влажных кристаллов молочного сахара в центрифуге	Не удается достигнуть полного выделения белковых веществ и фракционировать белковую массу, выделить мелкие кристаллы лактозы, которые уходят в мелассу
Консервирование	В основе консервирования лежат следующие процессы: - прекращение жизнедеятельности микроорганизмов; - прекращение биохимических процессов, происходящих в сыворотке под влиянием ферментов; - торможение окислительно-восстановительных реакций.	Доступность метода, простота аппаратурного оформления. Экономический эффект от консервирования сывороточных концентратов происходит за счет снижения их потерь при транспортировке и хранении на 8 – 12 %	Введение дополнительных компонентов в сыворотку отрицательно влияет на ее органолептические и технологические свойства: - ухудшает органолептику сухой сыворотки; - отрицательно влияет на процесс кристаллизации лактозы; - увеличивает износ вакуум-выпарных аппаратов вследствие коррозии греющих стенок

Продолжение таблицы

Биологические	Биологическую обработку молочной сыворотки проводят микроорганизмами, дрожжами, ферментами, полисахаридами (пектином, хитозаном) в целях повышения ее питательной ценности за счет обогащения полезными веществами или получения ряда специфических свойств и продуктов, обладающих лечебно-профилактическим действием	Одновременное сочетание доступности метода и возможности получения гаммы продуктов на основе молочной сыворотки, начиная от напитков и заканчивая антибиотиками, в том числе выделение сывороточных белков в нативном состоянии	Возможность протекания побочных процессов
Мембранные методы: микро-, ультра- и нанофильтрация	Сущность метода основана на способности преодоления компонентами молочной сыворотки селективно проницаемого барьера – мембраны	Разделение может выполняться непрерывно. Энергетические затраты, как правило, низкие. Мембранные процессы легко сочетаются с другими процессами разделения. Разделение выполняется в мягких условиях. Свойства мембран значительно различаются, и их можно контролировать. Не требуется каких-либо добавок. Возможность фракционирования компонентов молочной сыворотки. Деминерализация молочной сыворотки. Изменение кислотности сыворотки без внесения химических реагентов	Концентрационная поляризация и отложение осадков на мембране (ее загрязнение). Низкая скорость транспорта через мембрану. Короткое «время жизни» полимерных мембран
Обратный осмос	Процесс, в котором при определенном давлении проходит через полупроницаемую мембрану в обратном для осмоса направлении. Эффективен для концентрирования		
Электродиализ	Удаление катионов и анионов в поле электрических сил		
Методы концентрирования: Сгущение и сушка	Консервирующее воздействие в процессе сгущения молочной сыворотки достигается за счет повышения осмотического давления и накопления молочной кислоты	Уменьшается объем исходного сырья, снижаются транспортные расходы, увеличивается срок хранения	Энергоемкий процесс, сушильные установки громоздки. На греющих стенках вакуум- выпарного аппарата появляется трудноудаляемый пригар. Вследствие длительного теплового воздействия теряется часть витаминов и ферментов. Высокие капитальные и производственные затраты
Криоконцентрирование	Включает в себя две основные технологические стадии: образование смеси кристаллов льда с концентратом сыворотки и разделение полученной суспензии	Процесс протекает при низких температурах, что позволяет максимально сохранить свойства исходного продукта	

Сухие молочные концентраты, как отмечено в работе Володина Д. Н., наряду с сгущенными концентратами являются источником сухих веществ молока и характеризуются относительно невысоким содержанием белка и высоким содержанием лактозы и минеральных веществ [14]. Классическая схема (рис. 1.1) переработки сыворотки с получением сухого продукта, проиллюстрированная Володиным Д. Н. с соавторами, включает следующие этапы: предварительную очистку сыворотки от жира и казеиновой пыли; двухстадийный процесс концентрирования/сгущения сыворотки с применением баромембранных методов (нанофильтрации), и высокоэффективных вакуум-выпарных аппаратов пленочного типа; последующая кристаллизация лактозы в сыворотке; многостадийная сушка кристаллизованной сыворотки [15].

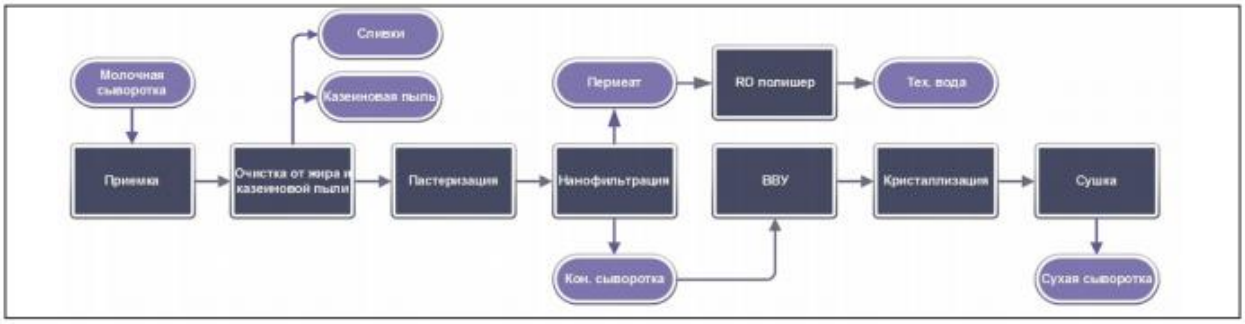


Рисунок 1.1 – Схема переработки молочной сыворотки с получением сухого продукта [15]

Евдокимовым И. А. показано, что выбор процесса нанофильтрации для концентрирования/сгущения сыворотки связан с удалением до 70 % воды получением частично деминерализованной сыворотки (до 30 %) и при этом имеет ряд преимуществ: повышение органолептических показателей готового продукта за счет улучшения кристаллизации и сушки; улучшение процессов кристаллизации и отделения кристаллов лактозы; повышение качества готового продукта [48, 60].По мнению Евдокимова И. А., нанофильтрация, в случае дальнейшей деминерализации сыворотки, позволяет увеличить производительность электродиализа [53].

Евдокимов И. А. в своей работе утверждает, что заимствованный зарубежный опыт использования вакуум-выпарных аппаратов пленочного типа (с

падающей пленкой) позволяет уменьшить воздействие температуры на сгущаемый продукт (температура процесса не превышает 65 °С), что в конечном итоге положительно сказывается на качестве готового продукта [47]. Не менее важным этапом технологического процесса, как отмечено Полянским К. К., является кристаллизация лактозы, с целью устранения гигроскопичности и агломерации частиц сухого продукта, а также придания лучшей растворимости сухой сыворотке [100].

Процесс сушки сыворотки, как показано в справочнике Гаврилова Г. Б., является наиболее энергоемким процессом, поэтому предварительная обработка ее мембранными методами и сгущение позволяет снизить последующие энергозатраты на удаление влаги из нее [19]. Автор указывает на целесообразность использования системы распылительной сушки в связи с наиболее высокой интенсивностью процесса и минимальным воздействием температур на высушиваемы материал. При этом в качестве греющего агента предпочтительнее использовать природный газ, а не пар, это более экономично, а также обеспечивает стабильность температуры сушильного воздуха, контактирующего с продуктом в сушильной башне. Сыворотка, полученная таким способом, обладает наиболее высокой растворимостью [15, 19].

Володиным Д. Н. отмечено, что классическая схема получения сухой сыворотки не является идеальной в рамках ее глубинной переработки. Поэтому для оптимизации производства автором. предложена модернизация такой линии посредством внедрения участка электродиализа вслед за процессом нанофильтрации [15]. Евдокимов И. А. утверждает, что электродиализ позволяет расширить сырьевую базу путем вовлечения в процесс производства творожной и казеиновой сыворотки. Технологическая линия до модернизации применима только к подсырной сыворотке [51]. В работе Золотаревой М. С. сказано, что главной особенностью электродиализа является то, что процесс не только обеспечивает почти полное удаление солей, но и органических (для творожной) и неорганических (для казеиновой) кислот [57]. Кроме того, сравнительно недавно оптимизированы и апробированы режимы, которые позволяют проводить

низкотемпературную обработку сыворотки при 10 – 15 °С. Такие режимы, по мнению Золотаревой М. С., способствуют снижению энергозатрат на нагрев сыворотки для процесса деминерализации, последующее охлаждение и обеспечивают микробиологическую безопасность продукта [61]. Учитывая вышеупомянутые особенности электродиализа, Евдокимовым И. А. отмечено, что помимо деминерализации происходит и значительное снижение титруемой кислотности, что особенно важно в процессах переработки творожной сыворотки, улучшаются органолептические (появление молочного сладкого вкуса) показатели и качество готового сухого продукта [51].

Извлечение отдельных компонентов из молочной сыворотки

Для извлечения отдельных компонентов из молочной сыворотки проф. Евдокимовым И. А. сформирована технологическая система производства молочного сахара [45, 117, 14], представленная на рисунке 1.2 [150].

Реализация данного направления, исходя из работы Храмцова А. Г., основана в основном на применении баромембранных методов. Как отмечено в статье Евдокимова И. А., баромембранные процессы подразделяются на четыре типа (табл. 1.8) [48].

В работах Храмцова А. Г. и Суюнчева О. А. говорится о том, что при первичной обработке молочной сыворотки – ее осветления и обезжиривания – получаются такие компоненты, как подсырные сливки и так называемая казеиновая пыль. Авторы акцентируют внимание на использовании данных компонентов в производстве плавленых сыров, творога [123, 130].

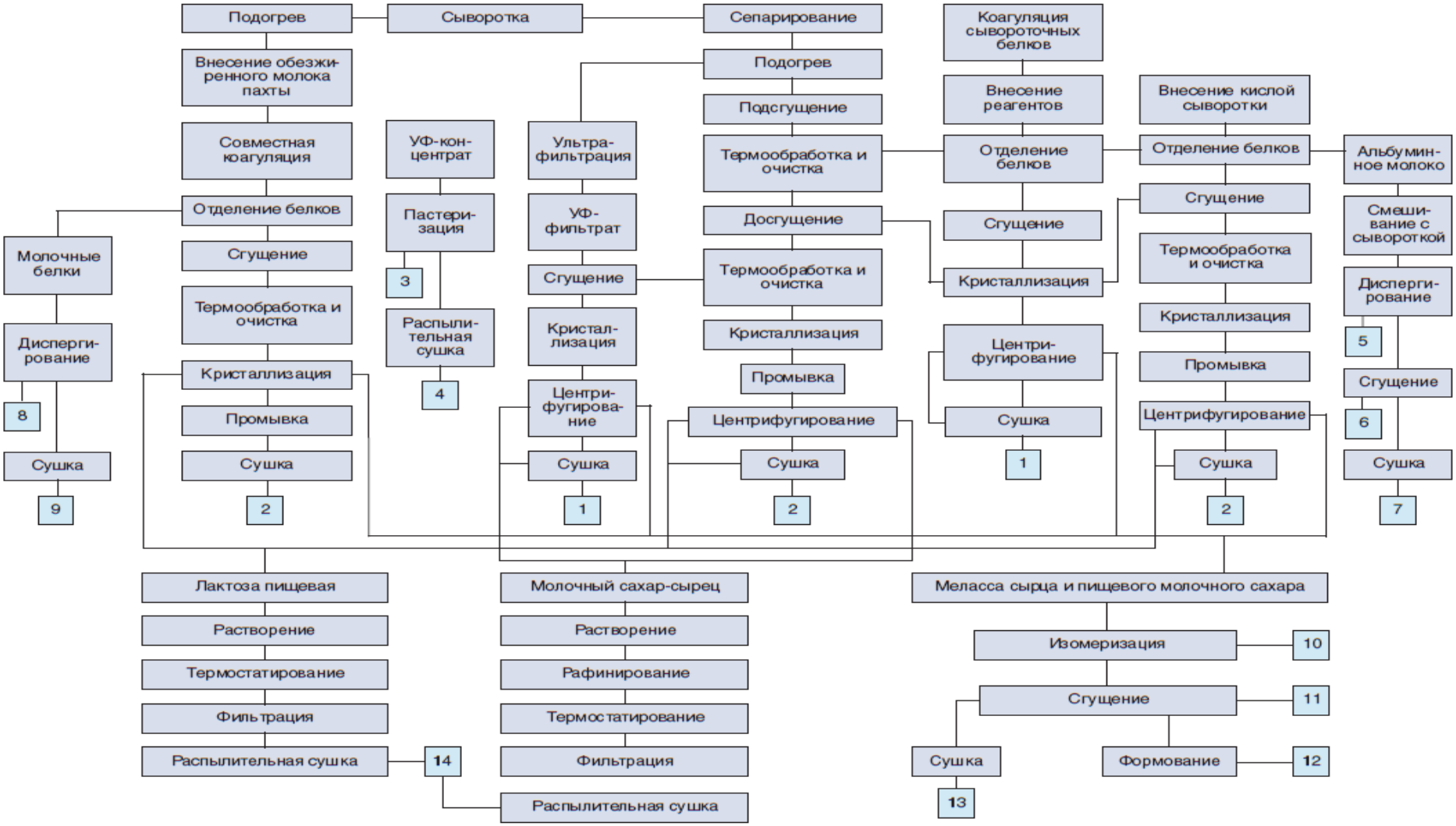


Рисунок 1.2 – Принципиальная схема переработки молочной сыворотки для извлечения отдельных компонентов: 1 – молочный сахар-сырец; 2 – лактоза пищевая кристаллическая; 3 – жидкий КСБ-УФ; 4 – сухой КСБ-УФ; 5 – жидкий КСБУ; 6 – сгущенный КСБУ; 7 – сухой КСБУ; 8 – КМБ в виде белковой массы; 9 – сухой КМБ; 10 – жидкая БИКОДО; 11 – сгущенная БИКОДО; 12 – блочная БИКОДО; 13 – сухая БИКОДО; 14 – лактоза аморфная с β формой [150]

Таблица 1.8 – Классификация баромембранных процессов [48]

Процесс	Размер задерживаемых частиц, мкм	Молекулярная масса частиц, кДа	Рабочее давление, МПа	Выделяемые вещества
Микрофильтрация	0,05–10	100–1000	0,1–0,8	Клетки бактерий, жировые шарики, фракции казеина
Ультрафильтрация	0,005–0,1	1–100	0,4–1,3	Коллоидные частицы и высоко-молекулярные вещества, такие как сывороточные белки, небелковые азотистые соединения
Нанофильтрация	0,001–0,005	0,5–1	0,7–4,0	Лактоза, небелковые азотистые соединения, частично минеральные вещества
Обратный осмос	Менее 0,001	0,1–0,5	2,7–7,0	Минеральные вещества

По Храмцову А. Г. процесс извлечения молочного жира (на уровне до 0,1%) [129] и казеиновых частиц отработан с использованием различных вариантов: от сепарирования в молочном сепараторе-сливкоотделителе с ручной периодической выгрузкой осадка до применения технологических схем с саморазгружающимися сепараторами [114]. Данной проблеме были посвящены систематические исследования Чеботарева Е. А. [153]. С целью совершенствования технологии выделения дисперсных фаз из молочной сыворотки и ее концентратов Е.А. Чеботаревым реализованы следующие инновации: выделение всех дисперсных фаз (жира, частиц казеина и скоагулированных сывороточных белков); выделение двух дисперсных фаз в сочетаниях: жир и частицы казеина; жир и скоагулированные сывороточные белки; казеиновые частицы и скоагулированные сывороточные белки; выделение одной дисперсной фазы (частицы казеина или скоагулированные сывороточные белки) [102]. Храмцовым А. Г. отработана технология выделения всех дисперсных фаз в виде липидного казеин-альбуминового концентрата под брендом «ЛипКА»[136].

Исходя из работы Вариводы А. А. следует, что очищенная от казеиновых частиц и жира сыворотка представляет собой чистый раствор водорастворимых сывороточных белков (альбумина и глобулина) и молочного сахара (лактозы) [11]. Способ молекулярно-ситовой фильтрации для извлечения белковых компонентов из молочной сыворотки, согласно классическому подходу по Липатову Н. Н., Мудлер М., Гавриловой Н. Б., Харитонову В. Д. [21, 72, 82, 127], включает баро- и электромембранную технологии, ионный обмен, гельфильтрацию, сорбцию и десорбцию. И, по мнению Гаврилова Г. Б и Храмцова А. Г., выделение сывороточных белков в нативном состоянии методом ультрафильтрации, а так же применение метода электродиализа для последующей обработки концентратов, являются наиболее востребованными отраслью [16, 150]. Гавриловым Г. Б. проведены широкомасштабные системные исследования в промышленных масштабах по баро- и электромембранной обработке подсырной сыворотки обратным осмосом, ультрафильтрацией и электродиализом концентрата сывороточных белков (далее КСБ) [20].

Предложенная Храмцовым А. Г. технологическая схема (рис. 1.2) позволяет получать из сыворотки различные белковые концентраты: концентрат сыворотки белково-углеводный (КСБУ); концентрат сывороточных белков (КСБ-УФ); концентрат молочных белков (КМБ) [150]. Согласно Гаврилову Г. Б и Кравченко Э. Ф. после процесса ультрафильтрации и сушки КСБ содержат от 35 до 85 % и могут быть использованы в производстве кондитерских изделий, кисломолочных, пастообразных творожных продуктов, мороженого, продуктов детского, диетического и геронтологического питания, а также специальных питательных высокобелковых смесей для различного контингента потребителей – от медицинского до спортивного питания [17-18]. Помимо этого, КСБ в жидком состоянии могут быть использованы для дальнейшей биотехнологической обработки с целью синтеза производных компонентов сывороточных белков и использования их в функциональном питании [65].

В статье Евдокимова И. А. отмечено, что в результате ультрафильтрации получается два продукта: ретентат – молочное сырье с повышенным содержанием белка, и пермеат – истинный раствор таких компонентов молока, как лактоза, минеральные вещества, кислоты. [49]. Основной проблемой, по мнению Евдокимова И. А., для всех видов пермеатов является повышенное содержание минеральных веществ, а для творожной сыворотки, еще и высокая кислотность. Таким образом, без дополнительной обработки (деминерализации путем электродиализа), как утверждает автор, пермеат плохо поддается сушке отрицательно влияет на состояние вакуум-выпарного и сушильного оборудования ввиду высокой минерализации [50]. Золотаревой М. С. показано, что для более глубокой очистки сырья в технологии молочного сахара является применение процессов ионного обмена и хроматографии. Автор предлагает проводить ионный обмен проводится после процесса электродиализа с целью удаления оставшейся части поливалентных ионов [58]. А для удаления остатков азотистых соединений и пигментов, утверждает Coralie Sowa, используется ионообменная хроматография низкого давления с симулированным движение подвижной фазы [162].

Безусловно, как считает Храмцов А. Г., качество молочной сыворотки как исходного лактозосодержащего сырья должно отвечать всем требованиям технологии, санитарии и гигиены с моделированием состава и свойств на уровне «идеальной системы». В этом плане на практике необходима линия ее первичной обработки. По мнению автора, непременной составляющей такой линии должна быть как минимум бактериальная санация, а лучше кондиционирование любого вида молочной сыворотки по необходимым для производства соответствующего продукта показателям (критериям безопасности) «идеальной системы» [143].

По схеме, предложенной Храмцовым А. Г. (рис.1.2), молочный сахар-сырец может вырабатываться четырьмя способами и направляться на

рафинирование, реализацию или производство аморфной лактозы пищевой с β-формой [119, 150].

Стоит упомянуть о том, что одним из важных этапов на пути к получению сывороточных ингредиентов и пищевой лактозы является извлечение из пермеата фосфата кальция осаждением путем регулирования pH растворами щелочей при температуре 50 ˚С [80]. Как утверждает Володин Д. Н., он может быть реализован в качестве пищевой добавки, выполняющей функции стабилизатора, регулятора кислотности, разрыхлителя, фиксатора окраски, эмульгирующей соли, антислеживающего агента и антикристаллизатора [15].

Храмцовым А. Г. показано, что принципиальная схема предусматривает безотходность производства, полное использование мелассы молочного сахара-сырца и пищевого для производства бифидогенной кормовой добавки (БИКОДО) или заменителей молока [150].

Переработка сыворотки с извлечением ее отдельных компонентов не ограничивается получением указанных продуктов и может быть проведена еще глубже с целью получения производных компонентов сывороточных белков, лактозы и т.д.

Синтез производных компонентов молочной сыворотки

Биотехнология молочной сыворотки – сравнительно молодое направление и все еще формирующееся [107].

По Храмцову А. Г. технологическая платформа синтеза производных компонентов сухого остатка молочной сыворотки включает три составляющих по трансформации основных соединений – продукты липолиза молочного жира (ЛипидОмика); протеолиза сывороточных белков (ПротеОмика); гидролиза (и не только) лактозы (Глико(Лакт)Омика) [113, 131].

Опираясь на мнение Рябцевой С. А., получение посредством липолиза производных из молочного жира сыворотки, идентичного по системологии исходному молоку-сырью, вряд ли пока экономически оправдано. Тем не

менее, автор утверждает, что при желании в результате липолиза возможно получение 9 насыщенных и 12 ненасыщенных жирных кислот, которые, как и глицериды, могут быть выделены для практического использования в соответствии с методологией функционального питания [113].

Особое место среди производных компонентов занимает проблематика лактозы и синтеза ее производных, которой в 2007 году был посвящен симпозиум «Лактоза и ее производные», а так же издана специальная одноименная с симпозиумом монография [117]. Разработка продуктов на основе гидролиза лактозы обусловлена их востребованностью в производстве продуктов ординарного, детского и лечебно−профилактического питания для людей с интолерантностью к лактозе. Ферментативный катализ лактозы молочной сыворотки ферментом β−галактозидазой (лактазой) позволяет получить продукты, обогащенные более сладкими по сравнению с лактозой, легко растворимыми усваиваемыми монозами − глюкозой и галактозой. На этой основе разработана технология гидролизованной молочной сыворотки в натуральном, сгущенном и сухом виде [43].

По мнению Храмцова А. Г. производные лактозы всегда имели место быть в технологиях живых систем (ЖКТ) и ферментированных (кисломолочных) продуктах – напитках, сыре, твороге, сметане. Автор отмечает, что возрождение получения производных (олигосахаридов) начался с середины XX века, особенно это относится к лактулозе – признанным бифидогенным фактором, способствующем лечению и профилактике желудочно-кишечных заболеваний [139, 144].

Учеными из ВНИИ маслоделия и сыроделия (ВНИИМС) разработан способ производства сиропа гидролизованной лактозы из творожной или казеиновой сыворотки, предназначенной для применения в качестве заменителя сахарного сиропа при производстве хлебобулочных и кондитерских изделий [86].

Творческим коллективом лауреатов премии Правительства РФ в области науки и техники, состоящих из ученых таких институтов, как

СевКавГТУ (н/в СКФУ), ВНИИ Молочной промышленности, МГУПБ (н/в МГУПП), НИИ детского питания, ВНИИ пищевой биотехнологии, сформирована технологическая платформа отечественного пребиотика лактулозы [146]. Лодыгиным А. Д. разработана система технологий бифидогенных концентратов из сыворотки и продуктов ее переработки (на основе производных сывороточных белков, лактозы и минерального комплекса) с регулируемым углеводным, аминокислотным и минеральным составом [74, 76, 147]. Бифидогенные концентраты, выработанные из молочной сыворотки, по предположению Синельникова Б. М. могут быть использованы в технологии продуктов цельномолочного производства, кисломолочные продуктов с использованием заквасочных культур пробиотических молочно-кислых микроорганизмов, мороженого, сгущенных молочных консервов, продуктов детского и диетического питания, мясных, хлебобулочных и кондитерских изделий, безалкогольных напитков, [73, 118, 148]. Кроме того, творческому коллективу под руководством Мельниковой Е. И. удалось синтезировать низкокалорийные подсластители и сахарозаменители с функциональными свойствами (пребиотическим эффектом) – D-тагатозу и L-фукозу [78-79].

Лодыгин А. Д. обращает внимание на класс новых перспективных пребиотиков – галактосахариды (ГОС), которые могут быть получены в результате реакции трансгалактозилирования лактозы [76]. ГОС – некариогенные низкокалорийные вещества, обладающие пребиотическими свойствами. По мнению Gorlov I. F. В Храмцова А. Г., они способствуют улучшению абсорбции минералов, особенно кальция, в толстом кишечнике и играют сдерживающую роль в развитии рака кишечника [149, 167, 169]. По мнению Симоненко С. В. ГОС – продукт будущего в детском и диетическом питании, выступающий альтернативным вариантом лактулозы [116]. Процессы синтеза ГОС широко изучены коллективом Сев-КавГТУ Лодыгиным А. Д., Храмцовым А. Г., Родной А. Б., Адаляном Г. В. и др [75-76, 87, 145, 149].

1.2 Функциональные продукты, получаемые с использованием модификации молочных белков

В соответствии с ГОСТ, функциональный пищевой продукт - пищевой продукт, предназначенный для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами здорового населения, снижающий риск развития заболеваний, связанных с питанием, сохраняющий и улучшающий здоровье за счет наличия в его составе физиологически функциональных пищевых ингредиентов [36].

Согласно распоряжению № 1873-р, утверждающим «Основы государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года, для достижения целей, направленных на сохранение и укрепление здоровья населения, профилактику заболеваний, обусловленных неполноценным и несбалансированным питанием, необходимо развитие производства пищевых продуктов, обогащенных незаменимыми компонентами, специализированных продуктов детского питания, продуктов функционального назначения, диетических (лечебных и профилактических) пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище [83].

По утверждению Пономарева А. Н. согласно ГОСТ Р 52349-2005 молочную сыворотку можно рассматривать как функциональный продукт, содержащий физиологически функциональные пищевые ингредиенты [101]. Данные о ее функциональности были представлены ранее в таблице 1.3 [132]. Таким образом, опираясь на отраслевую программу приказа министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 9 декабря 2013 г. № 459 «Об утверждении отраслевой программы «Внедрение технологий, основанных на применении возобновляемых видов сырья в агропромышленном комплексе России на 2014 - 2020 годы» для решения проблемы дефицита пищевого белка наиболее актуальны разработки, позволяющие получать белковые пищевые ингредиенты из молочной сыворотки. В этой связи технологические решения по глубокой переработке молочной сыворотки,

основанные на снижении уровня лактозы и минеральных компонентов, улучшении сенсорных характеристик, придании функциональных свойств, включают ее баромембранное фракционирование с последующим частичным ферментативным гидролизом или сочетанием ферментативного гидролиза с внесением заквасок, содержащих пробиотические микроорганизмы. Использование данного комплекса технологических приемов позволяет получать гидролизаты сывороточных белков со сниженной аллергенностью, нейтральным вкусом, выраженными антиоксидантными и гипотензивными эффектами [84].

Так, по мнению Рябцевой С. А., Королевой О. В. и др., протеолиз (гидролиз, ферментативный гидролиз) белкового комплекса молочной сыворотки заслуживает отдельного и особого внимания по многим причинам, связанными с аллергенностью некоторых фракций и аминокислот, ролью алиментарных факторов в заболеваемости и смертности от таких патологий, как сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, остеопороз, онкологические заболевания [65, 95, 113].

Ферментативный гидролиз – процесс расщепления белков до пептидов и аминокислот, протекающий с использованием протеолитических ферментов. Процесс сопровождается разрывом пептидных связей, с последующим присоединением молекулы воды и высвобождением пептидов и аминокислот. При этом, как считает Adler-Nissen J. вновь образовавшиеся пептиды могут выступать в качестве новых субстратов для фермента [156]. В то же время, Головач Т. Н. отмечено, что разрушение белков на пептиды и аминокислоты может быть осуществлено не только ферментативным способом, но и с использованием кислот и щелочей. Однако, по утверждению автора, при кислотном и щелочном гидролизе сложно контролировать продукты ферментативной реакции, а также наблюдается снижение питательных качеств и биологической ценности получаемых гидролизатов [24], причиной которого, по мнению Антонова В. К. и Рогова И. А., является частичное или полное разрушение незаменимых аминокислот

[8, 111]. В результате химического гидролиза может образоваться рацемическая смесь L- и D-форм аминокислот, последние же могут быть токсичны [180]. В работе Антонова В. К также упоминается и о повышенной трудоемкости процесса, связанной с нейтрализацией реагентов [8]. Агаркова Е. Ю. в своих работах утверждает, что ферментативный гидролиз протекает в мягких условиях: при температуре не выше 60 °С и атмосферном давлении [2] – в отличие от экстремальных параметров физического и химического воздействия. Не менее важным преимуществом ферментативного гидролиза, по мнению Березкиной К. А., является специфичность по отношению к типу пептидной связи, что позволяет контролировать процесс биокатализа и получать гидролизаты с различной степенью гидролиза белка [10]. Согласно исследованиям Clemente A. и Просекова А. Ю., аминокислотные последовательности ферментативных белковых гидролизатов соответствуют исходному сырью и более того, обладают специфическим биологическим действием [103, 161]. Кроме того, как показано в работе Головач Т. Н. и Fox P. F., белковые гидролизаты обладают технологическими преимуществами: лучшей растворимостью, стабильностью при высокотемпературной обработке и относительно высокой устойчивостью к осаждению при воздействии ряда факторов (pH, присутствие ионов металлов). [24, 166].

Ссылаясь на утверждение Королевой О. В., область целевого использования белковых гидролизатов определяется в первую очередь исходя из степени гидролиза (таблица 1.9) [65]. Beach-Larsen T. Указывает на целесообразность использования гидролизатов, содержащих 15-20% свободных аминокислот, ди-, три- и олигопептиды с молекулярной массой до 3000 Да, в спортивном питании и медицине (для энтерального зондового питания) [157]. На Европейской комиссии по функциональным продуктам в 1999 г. Br J Nutr озвучил предположение о целесообразности использования инфузионных растворов на основе индивидуальных аминокислот для парентерального (внутривенного) питания [165]. Особенно важным моментом в продуктах для детского питания и проведении диетотерапии, по

мнению Korhonen H, является абсолютно полное устранение аллергенных факторов. Например, для белков коровьего молока, в его работе показано, что гипоаллергенность достигается при снижении молекулярного веса пептидов в гидролизате ниже 2500-3000 Да [178]. А мало гидролизованные пептидные композиции из белков молока обладают технологическими свойствами и зарекомендовали себя в качестве эмульгаторов и пенообразующих агентов, как отмечено в работе Kahl J. , и используются при создании взбитых молочных продуктов [174].

Таблица 1.9 - Характеристики пептидных композиций из молочных белков в зависимости от их назначения [174]

Тип пептидной композиции	Степень гидролиза, %	Назначение	Молекулярная масса компонентов, Да
Мало гидролизованная	до 5	технологические добавки – пенообразователи, эмульгаторы	>8000
Средне гидролизованная	5-20	функциональные продукты с пониженной аллергенностью, специализированные пищевые продукты для лечебного и спортивного питания	3000-10000, минимальное содержание свободных аминокислот
Глубоко гидролизованная	20-50	гипоаллергенные пищевые продукты продукты для зондового питания	<3000 <1000, 15-20% свободных аминокислот
очень глубоко гидролизованная	>80%	смеси для парентерального питания	<500, преобладание свободных аминокислот

Подтверждением вышесказанного являются результаты работ не только зарубежных ученых Maruyama S., Meisel H., Niki E., но и отечественных – Агаркова Е. Ю., Антипова Т. А., Королева О. В., Федорова Т. В. Данные их исследований позволяют утверждать, что модифицированные путем ферментативного гидролиза молочные белки обладают как технологическими свойствами (влагосвязывающая,

эмульгирующая и пенообразующая способности), так и функциональными свойствами (антиоксидантная, иммуномодулирующая, гипотензивная активность) [1, 7, 64, 126, 182, 183, 186].

Обогащение сывороточными белками и их производными продуктов, отмечено Рябцевой С. А., предназначенными для диетотерапии разных групп населения, находит все большее применение не только за рубежом, но и в нашей стране [113].

Комплексный подход к решению данной проблематики представил в своей работе Круглик В. И. Автор разработал частные технологии четырех видов гидролизатов в зависимости от их функционального назначения: ФГМБ-1 – для продуктов энтерального питания (полуэлементных смесей); ФГМБ-2 – для гипоаллергенных продуктов лечебно-профилактической направленности; ФГМБ-3 – для гипоаллергенных продуктов лечебного назначения; ФГМБ-4 – для питания больных фенилкетонурией [67]. На основе данной концепции были разработаны технологии продуктов с использованием гидролизатов сывороточных белков под брендами НУТРИЛАК - для вскармливания детей с нарушениями функции органов пищеварения; входящих в группу риска по развитию аллергенных заболеваний и др. [67]; НУТРИЭН – для энетрального перорального или зондового питания при различных заболеваниях и нарушениях функций организма, в том числе и для онкологических больных [88-93]; НУТРИГЕН-ФКУ – добавки к пище для детей разного возраста и взрослых, больных фенилкетонурией [68].

Кроме того, отечественные ученые Харитонов В. Д. и Тутельян В. А. в своих работах высказали мнение о перспективности использования гидролизатов сывороточных белков в качестве ингредиентов для создания продуктов функционального и лечебно-профилактического назначения массового потребления. Гидролизаты молочных белков, имеющие в своем составе биоактивные пептиды, как считают авторы, позволят усилить

полезное влияние традиционных молочных продуктов на здоровье населения [125, 128].

Так, Агарковой Е. Ю. разработана технология мусса молокосодержащего на основе гидролизата сывороточных белков. Автором доказаны биофункциональные свойства полученных гидролизатов и опытных образцов продуктов с их использованием, а именно: антиоксидантный, гипотензивный и гипохолистеремический эффект. Такие продукты могут быть рекомендованы для диетического профилактического питания [3]. Так же Агарковой Е. Ю. вместе с соавторами разработан аэрированный творожный мусс, обогащенный АПФ-ингибирующими пептидами, что вновь доказывает перспективность использования гидролизатов молочных белков в качестве функциональных пищевых ингредиентов [5].

В работе Королевой О. В. отмечено, что молочные продукты, в том числе кисломолочные, традиционно являются продуктами массового потребления в РФ и рассматриваются в качестве основы здорового питания человека, способствуя сохранению здоровья, предупреждению ряда заболеваний и увеличению продолжительности жизни. А использование гидролизатов из молочной сыворотки, как источника биологически активных пептидов, совместно с заквасочными культурами, по мнению автора, позволяет усилить функциональные свойства и биологическое действие разрабатываемых функциональных продуктов [65]. Исследования Королевой О. В. с соавторами из ВНИИ Молочной Промышленности и КеМТИПП в этой области позволили разработать кефирный продукт на основе гидролизата белков молочной сыворотки и биокефир на основе гидролизата белков молочной сыворотки с добавлением концентрата пропионовокислых бактерий. Использование гидролизата сывороточных белков позволило получить продукты функциональной направленности, в частности с пониженной аллергенностью, а биоактивные ингредиенты кефирного грибка и пропионовокислых бактерий придали ему ряд немаловажных полезных

свойств: положительное влияние на ЖКТ, стимулирование иммунной системы, обогащение витаминами группы В и подавление нежелательной микрофлоры, в том числе патогенной [64]. Коржовым Р. П. на базе НИИ питания РАН проведена клинико-физиологическая оценка, полученного кефирного биопродукта [124]. Автор доказал функциональную эффективность продукта и по результатам оценки кисломолочному напитку присвоен статус диетического (профилактического) продукта питания для детей старше трех лет с проявлением пищевой аллергии на молочные белки [63].

Кручининым А. Г. в рамках диссертационной работы предложена технология совместной коагуляции молочных и растительных белков в производстве творожного продукта с пониженной аллергенностью и повышенным содержанием полноценного белка. Разработка данного творожного продукта основывалась на применении методов биокаталитической конверсии белков молока и дополнительном внесении менее аллергенных растительных белков [70]. Автором доказана повышенная усвояемость незаменимых аминокислот, отнгосительная биологическая ценность и пониженная остаточная антигенность по содержанию β-лактоглобулина, а также сумме казеиновых фракций и α-лактальбумина. В сравнении с натуральным творогом повышенная пищевая, энергетическая и биологическая ценность полученного продукта позволяет рекомендовать его для диетического и профилактического питания [71].

Кроме разработок в области традиционных молочных продуктов питания, гидролизаты белков молочной сыворотки нашли применение в производстве специализированных продуктов. Так, Петровой Е. И. и Гавриловой Н. Б. разработана технология получения биоактивного компонента для спортивного питания на основе гидролизата сывороточных белков [97]. Авторами также разработана технология продукта для спортивного питания с корректированными биологической и пищевой ценностью, с пробиотическими свойствами и обогащенного

функциональными ингредиентами. Для корректировки пищевой и биологической ценности ученые применили ранее разработанную технологию гидролизата сывороточных белков [22, 94].

1.3 Ферментные препараты для получения гидролизатов творожной сыворотки

Ферментные препараты, применяемые в пищевой промышленности

По мнению Полякова В. А. одним из перспективных направлений эволюции технологических процессов в перерабатывающих отраслях пищевой промышленности является использование высокоактивных биологических катализаторов, способствующих существенному увеличению выхода, повышению качества и продлению сроков хранения готовой продукции [98-99].

Ферментные препараты, опираясь на работу Римаревой Л. В., являются важным фактором, способствующим глубокой переработке сельскохозяйственного сырья. По утверждению автора, ферментативный гидролиз обеспечивает радикальное изменение функциональных свойств и фракционного состава сырья на различных этапах его переработки, расширяет возможности совершенствования традиционных пищевых технологий, а также создания новых видов пищевых продуктов, включая продукты функциональной направленности [108].

Классификация ферментов, принятая Комитетом по номенклатуре Международного союза биохимиков и молекулярных биологов (NC-IUBMB), подразделяет их на 6 основных классов по типу катализируемой реакции [187]:

- Оксидоредуктазы – катализируют окислительно-восстановительные реакции;
- Трансферазы – катализируют реакции переноса групп;
- Гидролазы – катализируют реакции присоединения или отщепления молекулы воды;

- Лиазы – катализируют реакции отщепления или присоединения групп негидролитическим путем по двойной связи;
- Изомеразы – катализируют реакции изомеризации;
- Лигазы, или синтетазы – катализируют реакции присоединения друг к другу двух молекул, сопряженные с расщеплением пирофосфатной связи.

По сведениям Грачевой И. М. в пищевой промышленности для гидролиза сырья растительного, животного и микробного происхождения в основном применяются ферменты, относящиеся к третьему классу – гидролазы [41]. Данный класс ферментов включает в себя 13 подклассов в зависимости от специфичности их действия при каталитическом расщепление определенных связей [164]:

- КФ 3.1 - сложноэфирная связь;
- КФ 3.2 – гликозидная связь;
- КФ 3.3 - эфирная связь;
- КФ 3.4 - пептидная связь;
- КФ 3.5 – непептидная углерод-азотная связь (C-N);
- КФ 3.6 - кислотно-ангидридная связь;
- КФ 3.7 – углерод-углеродная связь (C-C);
- КФ 3.8 - галоидалкидная связь;
- КФ 3.9 – азотно-фосфорная связь (P-N);
- КФ 3.10 – азотно-серная связь (S-N);
- КФ 3.11 – углеродно-фосфорная связь (C-P);
- КФ 3.12 – дисульфидная связь (S-S);
- КФ 3.13 – серо-углеродная связь (C-S).

Из работы Римаревой Л. В. следует, что ключевую роль в области пищевой биотехнологии играют несколько подклассов ферментов класса гидролаз (КФ 3.1, КФ 3.2 и КФ 3.4). К ним относятся эстеразы (пектинэстераза действует на пектин в растительных субстратах);

гликозидазы (амилазы, гемицеллюлазы, катализирующие гидролиз гликозидных связей в поли- и олигосахаридах); протеазы, катализирующие гидролиз белковых соединений [108]. Ферментные препараты для пищевой промышленности, их характеристики, способы воздействия на субстрат, области и эффективность их применения представлены в таблице 1.10 [108].

Таблица 1.10 – Основные ферментные препараты (ФП), применяемые в пищевой промышленности [108]

Основной фермент в ферментном комплексе	Продуценты	Оптимум действия ФП		Способ воздействия на субстрат и задачи применения ФП	Область применения и эффективность
		t, °C	pH		
I – Биоконверсия крахмала (α-амилаза, глюкоамилаза, пуллуланаза)					
Бактериальная α-амилаза	Bacillus subtilis	60 – 70	5,5 – 7,0	Для разжижения и декстринизации крахмала	В спиртовом, паточном, пивоваренном, хлебопекарном производствах для снижения вязкости зерновых замесов, увеличения выхода и качества целевого продукта
	Bacillus licheniformis	85 – 95	6,0 – 7,0		
Термостабильная α-амилаза	B. stearothermophilus	70 – 90	5,0 – 6,0		
	Pseulomonas fluorescense	60 – 97	5,0 – 6,5		
Грибная α-амилаза	Aspergillus oryzae	50 – 55	4,5 – 5,5	Для гидролиза крахмала до декстринов, олигосахаридов и мальтозы	
Глюкоамилаза	Aspergillus awamori	55 – 60	4,3 – 5,0	Для осахаривания частично расщепленного крахмала до глюкозы	В производстве спирта, пива, кристаллической глюкозы, глюкозо-фруктозных сиропов для интенсификации процессов и увеличения выхода готовой продукции
	Aspergillus niger	55 – 65	4,1 – 4,5		
Пуллуланаза	Aerobacter aerogenes				
	Bacillus pullulans	58 – 65	4,0 – 6,0		

Продолжение таблицы

II – биоконверсия белков (протеазы, трансглутаминаза)					
Бактериальные протеазы (протеаза Б)	Baccilus subtilis	50 – 60	6,5–10,0	Для гидролиза белков до пептидов с различной молекулярной массой	В производстве спирта, вина, пива, белково-аминокислотных ингредиентов, биологически активных добавок, хлебобулочных изделий. Переработка микробной биомассы, растительных, микробных и животных белков. Переработка молочной продукции. В производстве мясной и рыбной продукции
Грибные протеазы (протеазы ГК)	Aspergillus oryzae Aspergillus niger	50 – 55	4,7 – 5,3	Для протеолиза белков до низкомолекулярных пептидов и аминокислот	
Трансглутаминаза	Streptomyces mobaraensis	30 – 60	4,0 – 7,5	Для изменения структуры и функциональных свойств белков путем образования межмолекулярных связей между белками	
III – биоконверсия полисахаридов (пектиназы, ксиланазы, целлюлазы, β-глюканазы)					
β-глюканаза, ксиланаза, целлюлаза	Trichoderma viride, Trichoderma longibrachiatum и др.	50 – 65	5,0 – 7,0	Для гидролиза некрахмальных полисахаридов	В производстве спирта, пива, крахмала, кормов для снижения вязкости и повышения биодоступности субстрата, увеличения выхода готовой продукции

Продолжение таблицы

Пектиназа Пектинэстераза Полигалактуроназа	Aspergillus foetidus	40 – 50	3,5 – 5,5	Для гидролиза пектиновых веществ плодово-ягодного и растительного сырья	В консервном, соковом, винодельческом и ликеро-водочном производствах для снижения вязкости и повышения биодоступности субстрата, увеличения выхода и качества целевой продукции

В работах Римаревой Л. В. отмечено, что для гидролиза белковых субстратов применяют ферменты протеолитической направленности, которые по механизму действия, происхождению и эффективности воздействия на пептидные цепи подразделяются на две основные группы: пептидазы (экзопептидазы) (КФ 3.4 - 11-15) и протеиназы (эндопептидазы) (КФ 3.4 - 21-24) [109-110].

В статье Римаревой Л. В. сказано, что протеолитические ферменты первой группы подразделяются на основе механизма расщепления пептидных связей. Автор отмечает, что эти пептидазы в основном являются ферментами экзодействия, катализирующими гидролиз пептидной связи с N- и (или) С-конца пептидной цепи и подразделяются по подклассам [108]:

- α-аминоацилпептидгидролазы (КФ 3.4.11) - аминопептидазы;
- гидролазы пептидиламинокислот или ациламинокислот (КФ 3.4.12) - карбоксипептидазы;
- дипептидгидролазы (КФ 3.4.13) - дипептидазы;
- дипептидилпептидгидролазы (КФ 3.4.14) и пептидилдипептидгидролазы (КФ 3.4.15). Продуктами их гидролиза являются аминокислоты и низкомолекулярные пептиды.

Протеолитические ферменты второй группы (протеиназы), как указано в работе Римаревой Л. В., подразделяются в зависимости от особенностей механизма катализа, установленного по функционированию активного центра фермента, а также влияния pH на его активность [108].В процессе гидролиза с применением данных ферментов образуются пептиды с различной молекулярной массой. К данной группе ферментов относятся [164]:

- Сериновые эндопептидазы (КФ 3.4.21);
- Цистеиновые (КФ 3.4.22);
- Аспартатные эндопептидазы (КФ 3.4.23);
- Металлоэндопептидазы (КФ 3.4.24).

По утверждениям Сербы Е. М., Римаревой Л. В. и Аксеновой Л. М. совместное каталитическое воздействие экзо- и эндопептидаз на белковый субстрат позволяет обеспечить наиболее высокую степень его конверсии до свободных аминокислот и низкомолекулярных пептидов [6, 109-110, 115]. Кроме того, как отмечают некоторые исследователи, в гидролизатах, полученных с применением протеолитических ферментов образуются биоактивные пептиды, проявляющие иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства [173, 193].

Роль протеолитических ферментов в современной биотехнологии

По мнению Смирновой И. А. получение белковых гидролизатов с применением протеолитических ферментов является одним из наиболее перспективных направлений современной биотехнологии [122]. Кроме того, Theron L. W. и Sumantha A. уделяют внимание тому, что выбор ферментных препаратов необходимо осуществлять с учетом условий проведения технологических процессов, особенности структуры белковых субстратов и пептидного состава конечных продуктов [195, 197].

Ученые Veloorvalappil N. J., Robinson B. S и др., утверждают, что специфичность действия протеолитических ферментов, продуцируемых

мицелиальными грибами, позволяют обеспечить получение продуктов с заданными свойствами [200].

По утверждениям Беневоленской Е. А. и Kang C. основной проблемой при получении белковых продуктов является горечь белковых гидролизатов, обусловленная присутствием остатков гидрофобных аминокислот и пролина (циклическая аминокислота) в пептидах. Авторы отмечают, что пролин играет одну из ключевых физиологических ролей, защищая пептиды от ферментативного гидролиза, что может вызывать такие заболевания, как депрессия, болезнь Паркинсона и целиакия [96, 175].

Так, основываясь на работе Смирновой И. А., грибные аспартатные протеазы позволяют проводить ограниченный протеолиз широкого спектра белковых субстратов без образования горьких пептидов [121]. К тому же, по мнению ряда авторов, применение данных ферментных препаратов несмотря на широкую специфичность обеспечивает воспроизводимый выход продуктов, т.е. при одинаковых условиях гидролиза белка образуются одинаковые пептиды [190, 201, 204]. Theron L. W. в своей работе отмечает, что выбор в пользу аспартатных протеаз в некоторых технологических процессах обусловлен их высокой активностью при низких значениях pH 3–5 [197].

Из ряда источников известно, что основными ферментами, входящими в группу аспартатных протеаз, являются пепсиноподобные протеазы, продуцируемые грибами родов Aspergillus, Penicillium, Rhizopus и др [41-42, 190]. При этом, по мнению Цуриковой Н. В., грибы рода Aspergillus являются одними из наиболее перспектиных продуцентов ферментов. Как отмечает автор, аспергиллы способны синтезировать широкий спектр гидролитических ферментов амилолитического, протеолитического, целлюлолитического, липолитического комплексов и др [152].

Смирнова А. И. в своей работе отмечает, что пепсины микробного происхождения в промышленности представлены, главным образом, аспергиллопепсином I (КФ 3.4.23.18) и пенициллопепсином (КФ 3.4.23.20).

Данные представители обладают наиболее широкой субстратной специфичностью и аналогичными биохимическими и физико-химическими свойствами [121, 158].

Российский рынок ферментных препаратов, анализируемый в работе Смирновой И. А., представлен ферментными препаратами щелочных и нейтральных бактериальных протеиназ. Ассортимент грибных протеаз, по мнению автора, несколько ограничен в связи с их высокой стоимостью, обусловленной низким уровнем активности продуцентов [120]. Согласно работам Ward O.P. и Смирновой И. А. в настоящее время ферментные препараты аспартатных протеаз производятся компаниями «Amano Pharmaceuticals» (Япония), «DSM» (Нидерланды) и «Beijing Challenge Biotechnology Limited Company» (Китай) [121, 202]. По данным патента Беневоленской Е. А. в мировой практике основными продуцентами комплексных ферментных препаратов грибных эндо- и экзо-пептидаз являются штаммы рода Aspergillus. Так, например, широко известный ферментный препарат «Flavourzyme» («Novozymes A/S», Дания) получают на основе штамма Aspergillus oryzae [96].

Madadlou A совместно с коллегами успешно применил ферментный препарат «Flavourzyme» для выделения АПФ-ингибирующих пептидов из казеина [181]. Mizuno S с соавторами в своей работе показали, что «Flavourzyme» является наиболее эффективным ферментом среди девяти различных ферментных препаратов, используемых для получения ингибирующих АПФ пептидов из казеина [185]. Janitha P. K вместе с коллегами обнаружили АПФ-ингибирующую активность в гидролизатах дефибринированной бычьей плазмы, обработанной микробной протеазой «Flavourzyme»; наибольшую активность проявлял гидролизат со степенью гидролиза 43%, содержащий IC_{50} (концентрация ингибитора, приводящая к 50% ингибированию АПФ) порядка 1,08 мг/мл. Авторы выделили пептиды, содержащие Gly-Tyr-Pro, His-Leu(Ile), His-Pro-Tyr, His-Pro-Gly-His, Leu(Ile)-Phe, Ser-Pro-Tyr, и Tyr-Pro-His последовательности мотивов (аминокислот).

Некоторые из этих мотивов соответствуют последовательностям, существующим в бычьем сывороточном альбумине, что позволяет рассматривать бычью плазму в качестве потенциального источника ингибирующих АПФ пептидов [170].

Кроме того, Peña-Ramos и Xiong предположили, что при гидролизе изолята сывороточного белка (ИСБ) семью различными протеолитическими ферментами, «Flavourzyme» действовал как наиболее эффективный препарат для высвобождения антиоксидантных пептидов [189]. Помимо функциональных свойств, аспартатные протеазы позволяют получить гидролизаты с улучшенными технологическими свойствами. Так, например, в работе Merz M и Hrcova M отмечается, что гидролизаты, полученные с использованием ферментного препарата «Flavourzyme» обладают высокими эмульгирующими, пенообразующими [184] и гелеобразующими свойствами [168].

Испанским ученым Maria del Mar Yust с соавторами были получены белковые гидролизаты нута со степенью гидролиза в диапазоне от 1% до 10%, химический состав которых был очень близок к составу белкового изолята, используемого в качестве исходного сырья. Авторы исследовали основные технологические свойства гидролизатов такие, как растворимость, эмульгирующая способность и стабильность эмульсий, пенообразующую способность и стабильность пены. Все гидролизаты белка показали более высокую растворимость, чем интактные белки, особенно при pH вблизи изоэлектрической точки нативных белков нута. Кроме того, все гидролизаты обладали лучшими функциональными свойствами, кроме эмульгирующей способности, чем исходный белковый изолят [163].

По результатам проведенного аналитического обзора отечественных и зарубежных источников установлена перспективность использования творожной сыворотки в качестве сырья как с точки зрения возможности наиболее полного извлечения биологически ценных веществ, так и с точки зрения экологической составляющей и безотходности производства.

Рассмотрены основные приемы и методы глубокой переработки молочной сыворотки, в том числе и ферментативный гидролиз с целью получения функциональных ингредиентов. Изучены коммерчески доступные ферментные препараты с наиболее подходящей субстратной специфичностью по отношению к белкам творожной сыворотки. Показана актуальность применения отечественных биокатализаторов (ферментных препаратов) с целью интенсификации биотехнологических процессов, создания конкурентоспособной продукции нового поколения с заданными свойствами, а также реализации планов по импортозамещению.

2 ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Организация проведения исследований

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.

Рисунок 2.1. Блок-схема организации проведения исследований

2.2 Объекты исследований

Объектами исследования научно-исследовательской работы 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;

- 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.

2.3 Методы исследования

В ходе экспериментальной части настоящей диссертационной работы использовались общепринятые стандартизованные, модернизированные и адаптированные под конкретные задачи методы исследований. Основная часть исследований была выполнена на современном оборудовании, анализ результатов проводился посредством необходимых вычислительных программ, разработанных производителями аппаратуры.

Схема проведения исследований представлена на рис.2.1

Физико-химические показатели

- отбор проб и подготовку их для определения физико-химических показателей проводили в соответствии с ГОСТ 26809.1-2014 [25];

- массовую долю влаги и сухих веществ определяли по ГОСТ Р 54668-2011 [38];

- массовую долю жира определяли кислотным методом Гербера по ГОСТ 5867-90 [30];

- массовую долю белка измеряли методом Кьельдаля по ГОСТ 34454-2018 [29];

- массовую долю небелкового азота определяли методом Кьельдаля по ГОСТ Р 55246-2012 [40];

- массовую долю лактозы измеряли по ГОСТ 34304-2017 [37];

- определение массовой доли углеводов проводили по ГОСТ Р 54667-2011 [37];

- определение титруемой кислотности проводились титриметрическим методом по ГОСТ 54669-2011 [39];

- активную кислотность определяли потенциометрическим методом в соответствии с ГОСТ 32892-2014 [27];

- взбитость творожного продукта определяли по ГОСТ 31457-2012 [26].

Микробиологические показатели

Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) и бактерий группы кишечных паочек (БГКП) опытных образцов творожных продуктов осуществляли по ГОСТ 32901-2014 [28].

Органолептическая оценка

Постановка органолептических исследований осуществлялась согласно ГОСТ ISO 6658-16 [35]. Углубленный анализ органолептических показателей экспериментальных партий творожных продуктов проводили с применением теста «дуо-трио» по ГОСТ ISO 10399-2015 [31]. Оценку консистенции полученных продуктов проводили в соответствии ГОСТ ISO 11036-2017 [32]. Построение сравнительных диаграмм проводилось с использованием руководящих указаний по ГОСТ ISO 4121-16 [34]. Построение профильных диаграмм осуществляли в соответствии с ГОСТ ISO 13299-2015 [33].

Рекомендуемые ***сроки годности*** определяли в соответствии с МУК 4.2.1847-04 [81].

Определение степени синерезиса

Метод основан на определении количества сыворотки, выделившейся при центрифугировании 10 г творожного продукта в течение 10 мин при

частоте вращения 4000 мин$^{-1}$. Отношение объема выделившейся сыворотки к объему продукта является степенью синерезиса, выраженная в % (2.1).

$$C_{син} = \frac{V_1}{V_0} \cdot 100 \quad (2.1)$$, где

$C_{син}$ – степень синерезиса, %;

V_0 – общий объем эмульсии, см^3;

V_1 – объем отделившейся сыворотки, см^3;

Концентрат белков творожной сыворотки белков получали на ***пилотной ультрафильтрационной установке*** AL 362 производства компаниии ООО «Альтаир».

Установка, изображенная на рисунке 2.2 состоит из следующего основного технологического оборудования:

1. Емкость исходного продукта Е объемом 5 дм^3, снабженная рубашкой в целях термостатирования продукта;
2. Роторно-пластинчатый насос Н (Rotoflow 800 AISI, Н= 140 м, Q= 0,8 т3/ч, N= 0,75 кВт), снабжен частотным преобразователем (ПЧ) для изменения скорости подачи продукта;
3. Мембранный аппарат А (позиция 3), предназначенный для установки внутри его рулонных элементов РФЭ, изготовленных на основе ультрафильтрационных мембран;
4. Клапаны шаровые К1-К3;
5. Манометр на входе в мембранный аппарат PI;
6. Манометр на выходе из мембранного аппарата Р12;
7. Преобразователь расхода электромагнитный измерительный ИПРЭ -7 с допускаемой температурой измеряемой жидкости до + 90°С, с выходным сигналом постоянного тока пропорциональным объемному расходу от 0 до 5 мА. Состоит из преобразователя расхода первичного и отдельно устанавливаемого преобразователя измерительного;
8. Датчик температуры ДТ;
9. Теплообменник трубчатый;

10. Соединительные трубопроводы.

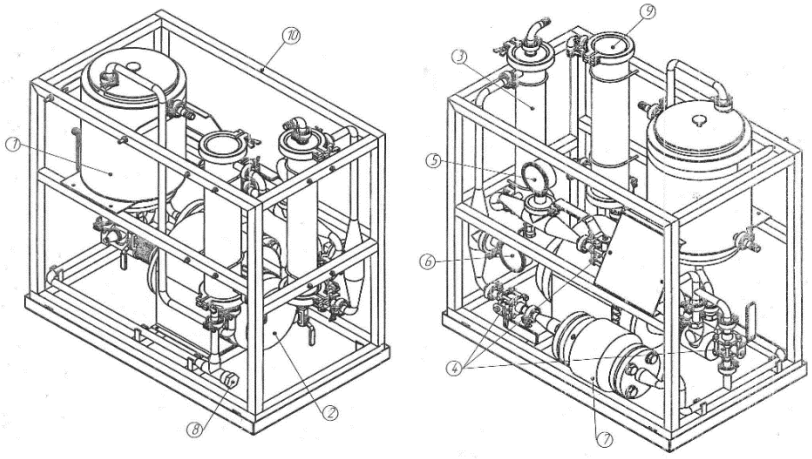


Рисунок 2.2 – Внешний вид пилотной установки AL 362

Для концентрации творожной сыворотки применяли рулонные мембранные элементы РФЭ на основе полиэфирсульфона. В таблице 2.1 представлены основные характеристики мембраны РФЭ

Таблица 2.1 – Основные характеристики рулонного мембранного элемента

Наименование показателя	Предельные значения
Площадь фильтрующей поверхности, $м^2$	0,24
Температура, ^oC	10-55
Селективность по альбумину,%	98,5
Активная кислотность	2-11
Давление, МПа	0,4-0,7
Порог задержки, кДа	1-5
Срок службы, мес.	12

Концентрирование белков творожной сыворотки

Подготовленная творожная сыворотка заливалась в исходную емкость Е (рисунок 2.3). Включение насоса Н с необходимой производительностью 35-50% производилось при полностью открытых шаровых клапанах К1 и К3 и далее происходило заполнение аппарата А и трубопроводов до появления

рециркуляционного потока по линии Е-Н-А-Т-Е. Далее по манометру PI1 производилась плавная регулировка давления на входе в мембранный аппарат с постепенным его повышением поднимая его постепенно до 0,4 -0,7 МПа. При этом давление на выходе из аппарата (манометр PI2) должно быть на 0,02- 0,06 МПа меньше давления на входе в аппарат. Пермеат, полученный в ходе концентрирования творожной сыворотки, сливался в заранее подготовленную емкость, а циркуляция концентрата происходила по контуру емкость ЕН- насос Н1 – аппарат А- теплообменник ТО – емкость ЕН. Для изменения режимов фильтрации производилось изменение производительности насоса поворотом резистора в диапазоне 25-100 %, или перекрытие (открытие) байпасного клапана К2.

Принципиальная схема работы пилотной установки AL 362 представлена на рисунке 2.3.

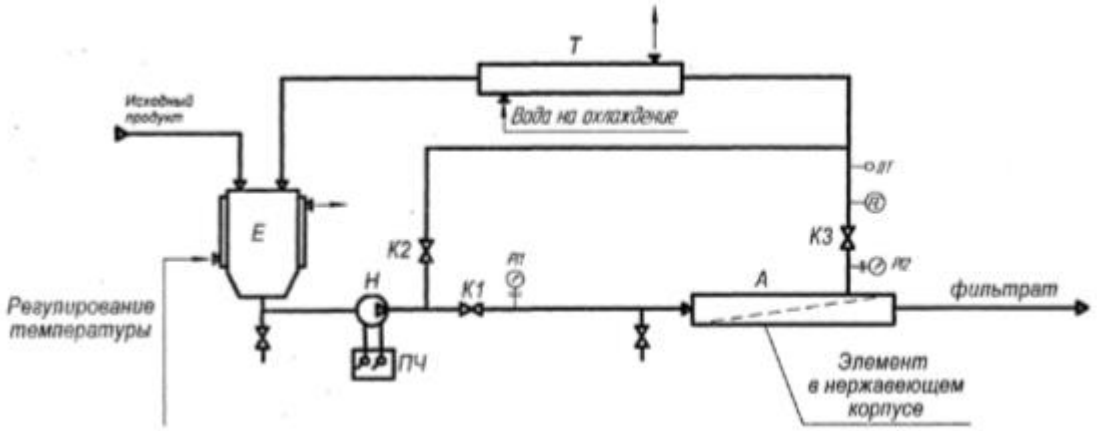


Рисунок 2.3 – Принципиальная схема пилотной установки AL 362

Протеолиз творожной сыворотки проводили в колбах 250 мл на многопозиционной магнитной мешалке с подогревом IKA RT5 Power (IKA Werke, Германия) при скорости перемешивания 66 об/мин. Точность поддержания температуры (±0,1°С) в процессе гидролиза контролировали с помощью термометра testo 104 (Testo, Германия). При проведении полнофакторного эксперимента по отработке условий проведения процесса

гидролиза КСБ кислыми протеазами варьировали температуру, продолжительность гидролиза и дозу вносимых ферментных препаратов. В КСБ, подогретый до требуемой температуры с pH 4,6, вносили необходимое количество ферментного препарата. В качестве контролируемых показателей в полученных образцах ГСБ определяли степень гидролиза, антиоксидантную активность и пенообразующую способность.

Определение аминного азота **[**85**]**

Определение аминного азота в ГСБ производили медным способом. Метод основан на способности аминокислот и различных пептидов образовывать комплексные растворимые соединения с медью, определяемой йодометрическим методом.

Сущность метода в следующем: к определенному количеству испытуемого раствора прибавляется при слабощелочной реакции избыток суспензии фосфорнокислой меди в боратном буферном растворе, в результате чего после взбалтывания раствора образуются медные соли большинства аминокислот.

Затем избыток фосфата меди отфильтровывается, и в прозрачном растворе после добавления CH3COOH и KI определяется медь объемным способом по выделяющемуся йоду путем титрования слабым Na2S2O3. При этом реакция протекает так:

2Cu(CH3COO)2 + 4KI = 2CuI2 + I2 + 4CH3COOH,

Каждый мл 0,01 н.Na2S2O3 соответствует 0,28 мг аминного азота.

В мерную колбу на 25 $см^3$ вносили 4 $см^3$ гидролизата и добавляли 0,1Н раствор NaOH до слабощелочной реакции. После этого в колбу вносили 15 $см^3$ суспензии фосфорнокислой меди, состоящей из раствора хлорной меди, трехзамещенного фосфата натрия и боратного буфера. Содержимое колбы доводили до метки дистиллированной водой, встряхивали и отфильтровывалди через складчатый фильтр. 10 $см^3$ фильтрата поместили в коническую колбу на 100 $см^3$ с добавлением 0,5 $см^3$ ледяной уксусной

кислоты и 0,3 г йодистого калия. Содержимое колбы титровали 0,01 раствором тиосульфата натрия.

Содержание аминного азота рассчитывали по формуле 2.2:

$$C = \frac{a \cdot 0{,}28 \cdot 25}{4 \cdot 10} \quad (2.2), \text{ где}$$

С – количество аминного азота в анализируемом образце, мг/см^3;

а – количество 0,01Н раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование пробы, см^3;

0,28 – коэффициент пересчета на аминный азот (1 см^3 0,01Н раствора тиосульфата натрия соответствует 0,28 мг аминного азота;

4 – количество исследуемого образца, взятого на анализ, см^3;

25 – объем, до которого был разведен отобранный исследуемый раствор после проведения цветной реакции, см^3,

10 – количество фильтрата, взятое на титрование, см^3.

Степень гидролиза определяли спектрофотометрическим методом согласно методике Spencer J. F. T. [194]. В 3 пластиковые фалькона объемом по 50 мл количественно переносили по 2 мл КСБ, ГСБ и воды (контрольная проба) и приливали по 10 мл 1% водного раствора додецилсульфата натрия (SDS). Полученные реакционные смеси инкубировали на водяной бане при температуре (75±1) °С в течение 15 минут.

В качестве стандарта для определения степени гидролиза, согласно методике Spencer J. F. T., использовали L-лейцин с концентрацией 3 ммоль/дм^3 с последующей серией разведений в 1% водном растворе SDS с концентрациями 0,15-3,0 ммоль/дм^3 [194]. Для проведения реакции взаимодействия аминогрупп с 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой в фальконы объемом 15 мл с различными концентрациями стандарта последовательно вносили 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, pH 8,20, 250 мкл 1% раствора SDS, 50 мкл пробы ГСБ в первом случае, 250 мкл пробы КСБ во втором случае, холостую пробу в третьем случае и 2 мл свежеприготовленного 0,1% раствора 2,4,6-тринитробензолсульфоновой

кислоты во все фальконы. Фальконы плотно закрывали и встряхивали на вортексе PV1 (Grant Bio, Великобритания). Полученные пробы инкубировали на водяной бане при температуре 50 °С в течение 1 ч. По завершении инкубации для остановки реакции в каждый фалькон вносили по 4,0 мл 0,1М раствора соляной кислоты. Фальконы плотно закрывали винтовыми крышками, встряхивали и выдерживали 30 мин при комнатной температуре для охлаждения. Оптическую плотность полученных растворов определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 (Bio Tek, США) при длине волны 340 нм. Для этого по 200 мкл раствора из каждого фалькона переносили в лунки 96-луночных несорбирующих УФ-прозрачных планшетов с плоским профилем дна UV-Star (Greiner BioOne, Германия) (рисунок 2.4). Определение проводили в 3 параллелях.

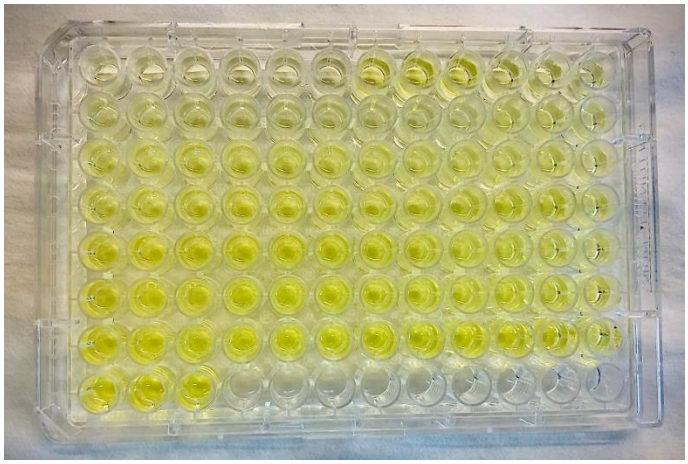


Рисунок 2.4 - УФ-прозрачный планшет с плоским профилем дна UV-Star

Для определения количества лейциновых эквивалентов в гидролизатах со 100 % степенью гидролиза отбирали 0,75 мл контрольных образцов КСБ и переносили в микрореакционный сосуд емкостью 5,0 мл (Supelco, США). Затем добавляли 0,75 мл дистиллированной воды и 2,4 мл 37% соляной кислоты. Сосуд инкубировали в сушильном шкафу в течении 23 часов при температуре (120±2) °С. По завершении инкубации охлажденные пробы фильтровали на воронке со стеклянным фильтром (пористость 2) под вакуумом. Содержимое микрореакционного сосуда количественно

переносили на фильтр, смывая дистиллированной водой. Водородный показатель промывных вод, поступающих в колбу Бунзена, контролировали с помощью универсальной индикаторной бумаги Lach-Ner до прекращения ее покраснения. Содержимое колбы Бунзена количественно переносили в лабораторный стеклянный стакан емкостью 100 мл. Активную кислотность фильтрата доводили до (7,00±0,02) ед. pH добавлением 40 % водного раствора гидроксида натрия. Нейтрализованный фильтрат количественно переносили в мерную колбу объемом 100 мл и доводили объем до метки 1 % водным раствором SDS. Содержимое колбы тщательно перемешивали на магнитной мешалке.

После оседания пены из мерной колбы отбирали пробу объемом 0,25 мл и проводили анализ. Степень гидролиза (СГ) белка в ГСБ рассчитывали согласно уравнению 2.3:

$$СГ = \frac{\left(\frac{(D^{340}_{гидролизат} - D^{340}_{хол.проба}) \cdot 30}{K} - \frac{(D^{340}_{УФ-концентрат} - D^{340}_{хол.проба}) \cdot 6}{K}\right)}{\left(\frac{(D^{340}_{КГ} - D^{340}_{хол.проба}) \cdot 133{,}33}{K} - \frac{(D^{340}_{УФ-концентрат} - D^{340}_{хол.проба}) \cdot 6}{K}\right)} \times 100 \quad (2.3),$$ где

$D^{340}_{гидролизат}$ - величина оптической плотности в образце гидролизата при 340 нм; $D^{340}_{хол.проба}$ - величина оптической плотности в холостой пробе при 340 нм; $D^{340}_{УФ-концентрат}$ - величина оптической плотности при 340 нм в пробе УФ-концентрата; 30 - фактор разбавления гидролизата; 6 - фактор разбавления сырья для получения гидролизата; K = 0,1733 л/моль – тангенс угла наклона калибровочного графика зависимости оптической плотности раствора при 340 нм от концентрации стандарта в пробе (рисунок 2.5); $D^{340}_{КГ}$ - величина оптической плотности в образце кислотного гидролизата (100% степень гидролиза) при 340 нм; 133,33 - фактор разбавления кислотного гидролизата.

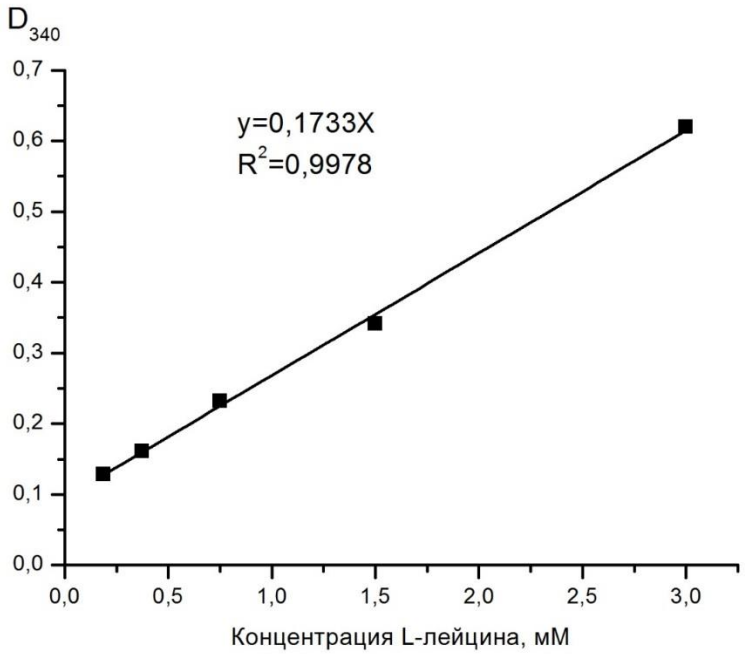


Рисунок 2.5 - Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора при 340 нм от концентрации стандарта в пробе

Антиоксидантную активность *in vitro определяли* по отношению к катион-радикалу АБТС. Катион-радикал АБТС получали по методу Re и соавт. [191] путем инкубации раствора, содержащего 7 мМ АБТС и 2,45 мМ пероксодисульфат калия, в темноте при комнатной температуре в течение 12-18 часов. Полученный концентрированный раствор катион-радикала АБТС разводили 50 мМ фосфатно-солевым буфером (с 100 мМ хлорида натрия), pH 7,40 (ФСБ) до $ОП_{734}$= 0,70±0,02, что соответствует конечной концентрации катион- радикала АБТС ~ 47 мкМ (ε_{734}=1,5×10^4 $моль^{-1}$×л×$см^{-1}$).

Для определения АОЕ в лунки 96-луночных несорбирующих полистирольных микропланшетов с плоским дном вносили по 20 мкл исследуемых образцов или раствора тролокса (холостая проба) и 180 мкл раствора катион-радикала АБТС. При определении АОЕ в качестве контроля использовали 180 мкл раствора катион-радикала АБТС и 20 мкл 50 мМ фосфатно-солевого буфера (с 100 мМ хлорида натрия), pH 7,40. Реакцию регистрировали по убыли $ОП_{734}$ в течение 40,5 мин с интервалом измерений каждые 60 с при температуре 25 ºС на фотометре-флуориметре Synergy 2

(BioTek, США). Для каждой концентрации стандарта и исследуемого образца измерения проводились в 4 повторностях.

При построении калибровочной кривой (рисунок 2.6) зависимости убыли оптической плотности от концентрации тролокса, его концентрацию в реакционной среде варьировали в пределах 1-10 мкМ. По убыли оптической плотности реакционной среды в присутствии исследуемых соединений определяли эквивалентные концентрации антиоксидантов в пробе. АОЕ образцов выражали в мкМ ТЭ. Рабочий диапазон факторов разбавления в 50 мМ фосфатно-солевом буфере, pH 7,40 при тестировании антиоксидантной активности образцов гидролизатов по отношению к катион-радикалу АБТС составил 150 раз.

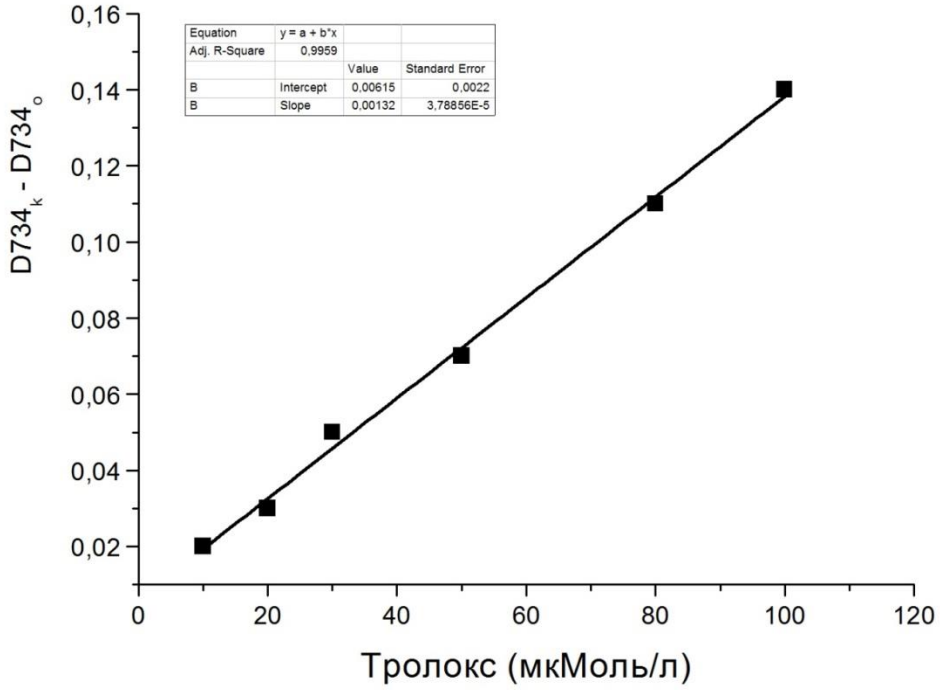


Рисунок 2.6 - Калибровочная кривая зависимости убыли оптической плотности растворов катион-радикала АБТС от концентрации Тролокса в пробе

Молекулярно-массовое распределение УФ-концентрата и гидролизата белков творожной сыворотки определяли методом высокоэффективной

жидкостной хроматографии [55]. Хроматографический анализ проводится на высокоэффективном жидкостном хроматографе Gilson (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France), оборудованном насосом типа 305, насосом типа 302 инжектором Rheodyne типа 7125 с петлей 20 мкл. Также использовался спектрофотометрический детектор Gilson 118 с переменной длиной волны. Хроматографическое разделение осуществляли с помощью хроматографической колонки фирмы Dr.Maisch ReproSil Pur-300 ODS-3 250*4.6, 5мкм. В качестве интегратора использовалось программное обеспечение «Мультихром». Градиентное элюирование осуществляли смесью двух растворителей. Растворитель А представлял собой 0,1% трифторуксусную кислоту в воде, а растворитель В - 95% ацетонитрил - 0,1% трифторуксусная кислота. Элюирование проводили при скорости потока растворителя 1,0 мл / мин с линейным градиентом от 5% В до 90% В в течение 60 минут, после чего следует возврат к исходным условиям в течение 5 мин. Детектирование проводили при длине волны 214нм. В полученных хроматограммах идентифицировали относительное содержание высокомолекулярной белковой фракции размером более 10 кДа, среднемолекулярной фракции размером от 3,5 до 5 кДа и от 5 до 10 кДа, а также свободных аминокислот размером менее 3,5 кДа.

При пробоподготовке для протеомного анализа 100 мг измельченного образца гомогенизировали в 2 мл в системе тефлон-стекло в лизирующем растворе следующего состава: 9М мочевины, 5% меркаптоэтанола, 2% тритона Х-100, 2% амфолинов pH 3,5 – 10. Полученный гомогенат осветляли центрифугированием при 800 g 5 мин и надосадочную фракцию, содержащую солюбилизированные белки (экстракт), использовали для фракционирования. В качестве основной протеомной технологии применяли двумерный электрофорез (ДЭФ) по О`Фарреллу с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE). Детекцию белков на двумерных электрофореграммах проводили окрашиванием кумасси голубым R-250 (CBB R-250) и далее последовательно азотнокислым серебром. Для

проведения компьютерной денситометрии использовали двумерные электрофореграммы, находившиеся во влажном состоянии. Их полные цифровые изображения и/или изображения отдельных фрагментов получали с помощью сканирования на сканере Epson Expression 1680. Сканирование выполняли в следующем режиме: разрешение 300 dpi, 48 bit Color, с сохранением результатов в формате - .TIFF. Полученные цифровые изображения редактировали в графическом редакторе и обсчитывали количественное содержание белков с помощью пакета программ ImageMaster 2D Platinum версий 7 («GE Healthcare», Швейцария). При определении количества белка использовалось не менее 3-х электрофореграмм с равным нанесением. Разброс значений оптической плотности составлял не более ±1,5%. Для идентификации белков отдельные фракции вырезали из ДЭ, измельчали вырезанные фрагменты и осуществляли их трипсинолиз. Далее соответствующие наборы пептидов изучали методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI - времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex («Bruker», Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500-8000 Да с калибровкой их по известным пикам аутолиза трипсина. Полученные масс-спектры («пептидные фингерпринты») расшифровывали с помощью традиционных биоинформационных технологий. Анализ полученных масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США), с точностью определения массы MH+ равной 0.01%.

Реологические характеристики экспериментальных образцов творожных продуктов определяли на ротационном вискозиметре «Реотест-2» [62], состоящий из 4 основных узлов: станины, переключающих приводов, измерительной части и измерительной головки, включающей в себя измерительный цилиндр (ротор), измерительную емкость (стакан) и термостат. С целью описания реологических свойств образцов йогуртов строили кривые текучести, которые определяли зависимость касательного напряжения от

градиента напряжения на срез. Повышение скорости деформации производили увеличением числа оборотов измерительного цилиндра путем переключения привода (последовательность позиции 1а, 2а, 3а, ..., 12а), фиксируя значения, отсчитанные со шкалы индикаторного прибора. Установка требуемой ступени частоты вращения производилась путем поворота переключающего рычага. Для записи кривых гистерезиса фиксировали касательное напряжение для возрастающих и убывающих градиентов напряжения на срез.

По окончании измерения производили расчет касательного напряжения (τ_r) (уравнение 2.4) и динамической вязкости (n) (уравнение 2.5).

$$\tau_r = z \cdot a \text{, где} \qquad (2.4)$$

z – константа цилиндра $\frac{дн}{см^2} \cdot \frac{1}{делшкалы}$;

а - значения, отсчитанные со шкалы индикаторного прибора (деления шкалы)

$$n = \frac{\tau_r}{D_r} \cdot 100\text{, где} \qquad (2.5)$$

D_r – градиент напряжения на срез, $сек^{-1}$

Математическую и статистическую 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.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Сравнительная оценка ферментных препаратов и оценка эффективности их действия

В соответствии с поставленными задачами на первом этапе исследовательской работы была проведена сравнительная оценка ферментных препаратов (ФП), продуцентов Aspergillus oryzae и Aspergillus niger. Данные представлены на масс-спектре (рисунок 3.1) и электрофореграмме (рисунок 3.2).

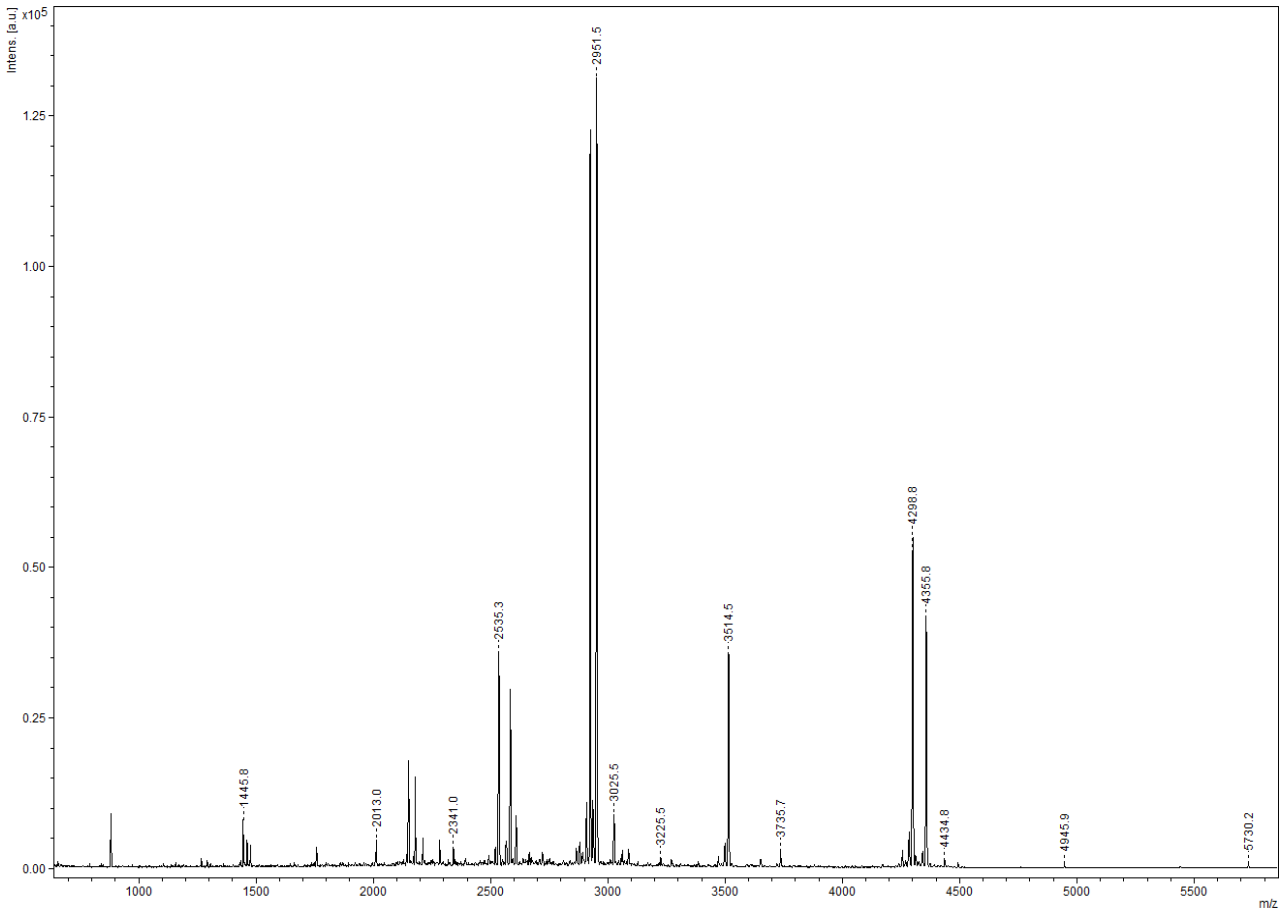


Рисунок 3.1 - Масс-спектр препаратов *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae* (13 и 14 пики соответственно)

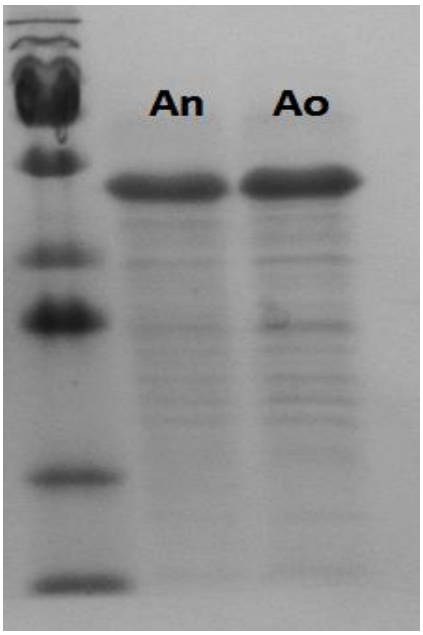


Рисунок 3.2 – Электрофореграмма ферментных препаратов (**An** – ФП продуцента Aspergillus niger; **Ao** – ФП продуцента Aspergillus oryzae)

Оба белка охарактеризованы как аспергиллопепсин, аспартатная протеаза repA.

Оценка эффективности действия ферментных препаратов

Для исследования оценки эффективности действия ферментных препаратов была использована сыворотка творожная натуральная, предварительно отсепарированная на лабораторной сепараторе-очистителе (при температуре 40 – 45 ºС и рабочей частоте вращения барабана 12000±4000 об/мин) с целью удаления казеиновых частиц и излишнего жира. Основные физико-химические показатели сыворотки представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 Физико-химические показатели творожной сыворотки

Наименование показателя	Фактические значения
Массовая доля общего белка, %	0,91
Содержание общего азота, %	0,14
Содержание небелкового азота, %	0,044
Содержание аминного азота, %	0,0123
Массовая доля лактозы, %	4,01
Массовая доля сухих веществ, %	5,08
pH, ед	4,6

При проведении исследования была поставлена задача оценить динамику накопления аминного азота в гидролизатах с применением ферментных препаратов продуцента Aspergillus niger (ФП-1) и Aspergillus oryzae (ФП-2) с различной дозой их внесения (табл. 3.2). Гидролизу подвергали 10 образцов с различной дозой вносимого фермента и, в качестве контрольного образца, использовали негидролизованную творожную сыворотку. Доза внесения фермента рассчитывали по формуле (3.1):

$$М_ф = \frac{Б \cdot a}{A} \cdot 1000 \text{ (3.1), где}$$

Б – содержание белка в 100 г. сыворотки;

а – требуемая активность фермента;

А – исходная активность фермента.

Таблица 3.2 – Активность и доза внесения фермента в творожную сыворотку

Активность фермента, ед./см^3 (E/S)	Доза внесения фермента на 100 г сыворотки, мг			
	№ образца	ФП-1	№ образца	ФП-2
0,5	1.1	0,76	2.1	1,14
1,5	1.2	2,28	2.2	3,41
2,5	1.3	3,79	2.3	5,69
3,5	1.4	5,31	2.4	7,96
4,5	1.5	6,83	2.5	10,24
5,5	1.6	8,34	2.6	12,51
6,5	1.7	9,86	2.7	14,79
7,5	1.8	11,38	2.8	17,06
8,5	1.9	12,89	2.9	19,34
9,5	1.10	14,41	2.10	21,61

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. Данные расчетов представлены в таблице 3.3. На основании полученных данных построена зависимость накопления аминного азота от дозы вносимого ФП (рисунок 3.3).

Таблица 3.3 Содержание аминного азота и степень гидролиза в экспериментальных образцах

№ образца	Содержание аминного азота, мг%	Степень гидролиза, %	№ образца	Содержание аминного азота, мг%	Степень гидролиза, %
Контроль	12,30	-	Контроль	12,30	-
1.1	14,00	1,33	2.1	22,05	7,67
1.2	14,54	1,72	2.2	22,75	8,22
1.3	14,88	2,04	2.3	23,45	8,77
1.4	15,23	2,27	2.4	24,15	9,32
1.5	15,75	2,74	2.5	25,37	10,26
1.6	16,10	2,98	2.6	26,08	10,81
1.7	16,27	3,13	2.7	27,30	11,75
1.8	16,63	3,37	2.8	28,11	12,37
1.9	16,97	3,68	2.9	28,53	12,69
1.10	17,50	4,07	2.10	28,70	12,84

По результатам исследования накопления аминного азота в процессе гидролиза (таблица 3.3, рисунок 3.3) можно заключить, что его количество при использовании различных доз внесения фермента продуцента Aspergillus niger практически не изменяется. При этом максимальная степень гидролиза в данном случае составляет 3,7%. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что данный фермент слабо катализирует реакции расщепления

полипептидной цепи. Это может быть связано либо с субстратной специфичностью, либо с тем, что выбранные режимы не являются показательными для отслеживания эффективности проведения гидролиза. В случае с применением ферментного препарата продуцента Aspergillus oryzae наблюдалась диаметрально противоположная картина. С увеличением дозы вносимого фермента интенсивность накопления аминного азота существенно выше, чем в первом случае. При минимальном фермент-субстратном соотношении (E/S=0,5) степень гидролиза 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.

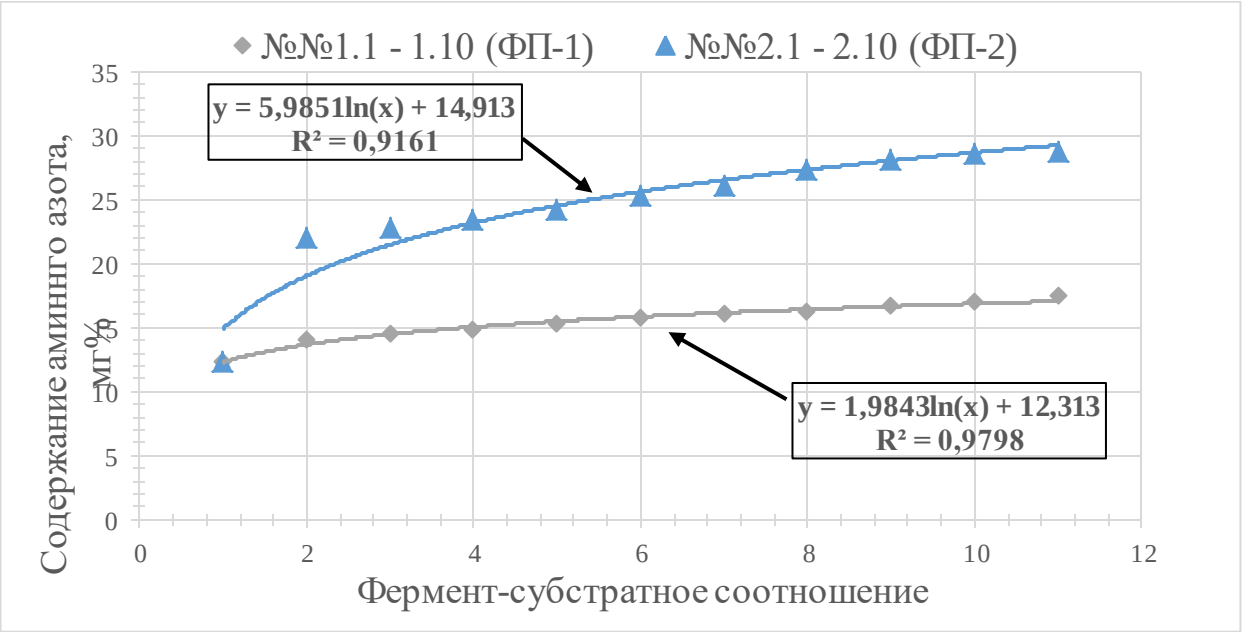


Рисунок 3.3 – Динамика накопления аминного азота в процессе гидролиза белков творожной сыворотки кислыми протеазами

Для проверки поставленной гипотезы представляло интерес исследовать влияние длительности гидролиза на содержание аминного азота в полученных образцах. Во все образцы (№№1.11-1.15 с ферментом Aspergillus niger и №№2.11-2.15 с ферментом Aspergillus oryzae) было внесено одинаковое количество соответствующих ферментов с активностью

10 ед./см^3. Температурный режим остался прежним – 30°С. При этом варьировалась только продолжительность проведения гидролиза. Результаты представлены в (табл. 3.4).

Таблица 3.4 – Продолжительность проведения гидролиза и количество аминного азота в полученных гидролизатах

№ образца	Продолжительность гидролиза, ч	Содержание аминного азота, мг%	Степень гидролиза, %
1.11	1	15,61	2,59
1.12	2	17,70	4,23
1.13	3	19,59	5,72
1.14	4	21,03	6,81
1.15	5	22,40	7,91
2.11	1	27,96	12,26
2.12	2	28,67	12,82
2.13	3	28,88	13,00
2.14	4	29,05	13,16
2.15	5	29,00	13,06

Как показали результаты исследования (табл. 3.4, рис. 3.4), с увеличением продолжительности процесса гидролиза, его интенсивность при использовании ферментного препарата продуцента Aspergillus niger возросла. Отмечено увеличение степени гидролиза порядка 50% по отношению к гидролизату, полученному при продолжительности процесса гидролиза 2 часа и фермент-субстратном соотношении 9,5 (образец № 1.10). При этом, степень гидролиза составила 7,9% (образец № 1.15). Что касается гидролизатов, полученных с применением фермента продуцента Aspergillus oryzae, то в данном случае с увеличением продолжительности гидролиза достигается максимальная степень гидролиза 13,2% (образец № 2.14) и далее происходит ингибирование процесса, что говорит об окончании

каталитических процессов. Таким образом эффективность работы ферментного препарата продуцента Aspergillus oryzae выше ферментного препарата продуцента Aspergillus niger. Слабая эффективность действия второго связана, вероятнее всего, с высоким значением гидромодуля, т.е. с высоким содержанием воды и низким содержанием белка (сырья) в нативной творожной сыворотке.

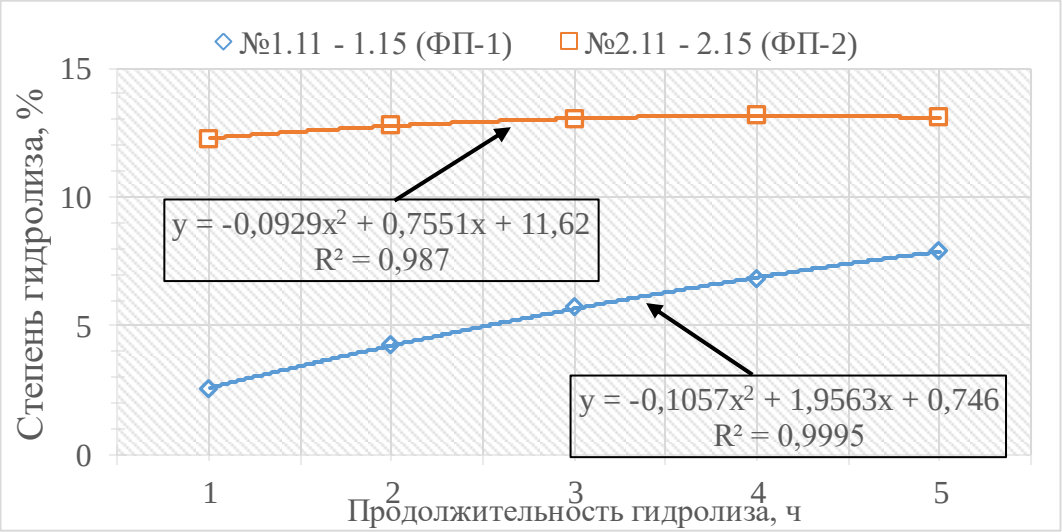


Рисунок 3.4 – Зависимость степени гидролиза от продолжительности процесса гидролиза полученных образцов

Анализ полученных результатов создает предпосылки для продолжения исследований, направленных на концентрирование творожной сыворотки с целью увеличения содержания белка в образцах и дальнейшее изучение гидролизатов, полученных на ее основе.

Концентрирование творожной сыворотки

На ультрафильтрационной установке проведено концентрирование творожной сыворотки. Фактор концентрирования составил 3,6.

После проведения концентрирования были получены образцы концентрата творожной сыворотки (КСБ), физико-химические показатели которых представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 Физико-химические характеристики полученного концентрата творожной сыворотки

Наименование показателя	Фактические значения
1	2
Массовая доля жира, %	0,75
Массовая доля общего белка, %	3,28
Содержание общего азота, %	0,52
Содержание небелкового азота, %	0,159
Содержание аминного азота, %	0,0385
Массовая доля лактозы, %	5,01
Массовая доля сухих веществ, %	8,53
pH, ед	5,0

С целью установления однородности условий проведения эксперимента, pH концентрата белков творожной сыворотки был доведен до значения 4,6 ед. 80%-ной молочной кислотой.

Для получения сопоставимых результатов, полученные образцы КСБ подвергали гидролизу с параметрами, аналогичными неконцентрированным образцам (Продолжительность 2 часа; температура 30°С). Учитывая изменение массовой доли белка в анализируемом образце, откорректирована доза внесения ферментных препаратов. Данные представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 - Активность и доза внесения ферментных препаратов в творожную сыворотку, после концентрирования.

Активность фермента, ед./см^3 (E/S)	Доза внесения фермента на 100 г КСБ, мг			
	№ образца	ФП-1	№ образца	ФП-2
0,5	КСБ-1.1	2,34	КСБ-2.1	4,1
1,5	КСБ-1.2	7,03	КСБ-2.2	12,3
2,5	КСБ-1.3	11,71	КСБ-2.3	20,5

Продолжение таблицы

3,5	КСБ-1.4	16,4	КСБ-2.4	28,7
4,5	КСБ-1.5	21,09	КСБ-2.5	36,9
5,5	КСБ-1.6	25,77	КСБ-2.6	45,1
6,5	КСБ-1.7	30,46	КСБ-2.7	53,3
7,5	КСБ-1.8	35,14	КСБ-2.8	61,5
8,5	КСБ-1.9	39,83	КСБ-2.9	69,7
9,5	КСБ-1.10	44,51	КСБ-2.10	77,9

После проведения гидролиза, исследовали динамику накопления аминного азота и рассчитывали степень гидролиза в полученных образцах. Кроме того, оценивали наличие/отсутствие горького привкуса полученных гидролизатов. Результаты исследований представлены в таблице 3.7 и на рисунке 3.5.

Таблица 3.7 – Количество аминного азота в полученных гидролизатах концентрата творожной сыворотки

№ образца	Содержание аминного азота, мг%	Степень гидролиза, %	Горький привкус
Контроль	38,50	-	-
КСБ-1.1	42,20	1,19	-
КСБ-1.2	45,50	2,25	-
КСБ-1.3	49,00	3,37	-
КСБ-1.4	52,50	4,49	+
КСБ-1.5	52,50	4,49	+
КСБ-1.6	54,25	5,06	+
КСБ-1.7	57,75	6,18	+
КСБ-1.8	61,29	7,32	++
КСБ-1.9	64,80	8,43	++
КСБ-1.10	63,00	7,87	++

Продолжение таблицы

КСБ-2.1	60,41	7,03	-
КСБ-2.2	63,70	8,09	-
КСБ-2.3	68,90	9,76	-
КСБ-2.4	70,88	10,39	-
КСБ-2.5	72,63	10,96	-
КСБ-2.6	75,25	11,80	-
КСБ-2.7	78,75	12,92	-
КСБ-2.8	80,85	13,60	+
КСБ-2.9	81,57	13,83	+
КСБ-2.10	81,38	13,77	++

Анализируя полученные данные (табл. 3.7, рис. 3.5) можно заключить, что повышенное содержание белка существенно влияет на эффективность действия ферментного препарата. Интенсификация процесса гидролиза заметно увеличилась при использовании фермента продуцента Aspergillus niger по сравнению с процессом гидролиза нативной творожной сыворотки. При аналогичных условиях проведения процесса гидролиза отмечено явное увеличение степени гидролиза. Но, несмотря на подтверждение рабочей гипотезы, об увеличении массовой доли белка, эффективность работы ферментного препарата продуцента Aspergillus niger существенно ниже, чем фермента продуцента Aspergillus oryzae. Так, например, в первом случае (образцы №КСБ-1.1-КСБ-1.10) 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 во втором случае степень гидролиза составила 7,03%, а при максимальной – 13,8%.

Кроме всего прочего, полученные гидролизаты отличались и по органолептическим характеристикам. При использовании ферментного

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

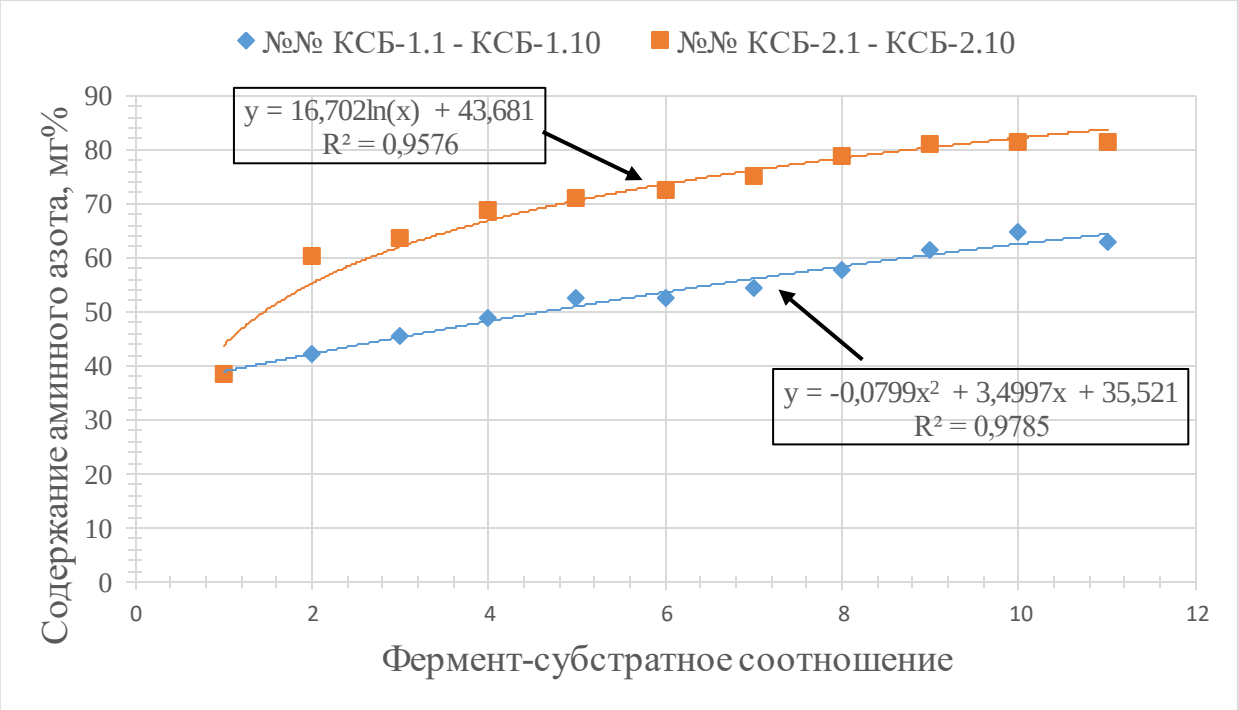


Рисунок 3.5 – Динамика накопления аминного азота в процессе гидролиза концентрата белков творожной сыворотки кислыми протеазами

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ферментный препарат продуцента Aspergillus niger обладает низкой эффективностью и придает полученным гидролизатам горечь, которая может заметно повлиять на органолептический профиль разрабатываемого продукта.

Учитывая вышесказанное, на следующих этапах, а также 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 (таблица 3.8). Выходными параметрами являлись степень гидролиза (DH) и антиоксидантная активность (TEAC).

Уровни вариации независимых параметров представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Уровни вариации независимых параметров при многофакторном эксперименте по оптимизации условий гидролиза творожной сыворотки

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	+1
Температура, °С	X1	30	40	50
Продолжительность гидролиза, мин	X2	60	120	180
E/S,%	X3	0,5	4,5	9,5

Композиционный план полнофакторного эксперимента по оптимизации условий ферментативного гидролиза УФ-концентрата молочной сыворотки представлен в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Композиционный план полнофакторного эксперимента

№ образца	Вариабельные факторы		
	T (X_1)	t (X_2)	E/S (X_3)
Контроль 1	-1	1	-
Контроль 2	0	1	-
Контроль 3	1	1	-
4	-1	-1	-1
5	-1	-1	0
6	-1	-1	1
7	-1	0	-1
8	-1	0	0
9	-1	0	1
10	-1	1	-1
11	-1	1	0
12	-1	1	1

Продолжение таблицы

13	0	-1	-1
14	0	-1	0
15	0	-1	1
16	0	0	-1
17	0	0	0
18	0	0	1
19	0	1	-1
20	0	1	0
21	0	1	1
22	1	-1	-1
23	1	-1	0
24	1	-1	1
25	1	0	-1
26	1	0	0
27	1	0	1
28	1	1	-1
29	1	1	0
30	1	1	1

Дозы внесения ФП в пересчете на 1 г белка представлены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Дозы внесения ФП в пересчете на 1 г белка

Фермент-субстратное соотношение	Доза внесения фермента на 100 г сыворотки, мг
0,5	4,1
4,5	36,9
9,5	77,9

Ферментативный гидролиз проводили следующим образом: ФП вносили в предварительно подогретый концентрат творожной сыворотки до температуры гидролиза, а именно 30 °С, 40 °С и 50 °С; продолжительность от 60 до 180 мин. Величина активной кислотности 4,6 ед. pH. В качестве контроля были использованы концентраты сывороточных белков.

Гидролиз проводили на термостатируемой водяной бане с постоянным перемешиванием. По окончании процесса гидролиза образцы нагревали до

температуры 80 °С с выдержкой 15 мин с целью инактивации ФП. Далее образцы охлаждали и разливали в стерильную посуду.

Результаты эксперимента по оптимизации условий ферментативного гидролиза белков творожной сыворотки представлены в таблице 3.11.

Таблица 3.11 – Результаты полнофакторного эксперимента по оптимизации условий ферментативного гидролиза белков творожной сыворотки

№ образца	Горький привкус	Степень гидролиза (DH), %	TEAC, ТЭ ммоль/л
Контроль 1	-	0	5,30
Контроль 2	-	0	4,17
Контроль 3	-	0	2,65
4	-	7,82	4,17
5	-	10,02	7,58
6	+	12,68	7,20
7	-	8,41	4,55
8	-	11,29	5,68
9	+	13,07	6,74
10	-	8,59	5,19
11	+	11,92	6,36
12	++	13,06	8,71
13	-	7,31	7,58
14	-	11,43	6,06
15	-	13,13	8,71
16	-	8,21	5,30
17	-	11,88	9,09
18	-	15,35	9,81
19	-	8,24	1,14
20	-	12,08	8,71
21	+	15,75	4,55
22	-	8,43	3,41
23	-	11,28	5,30
24	-	15,08	4,55
25	+	9,01	3,03
26	-	13,07	4,92
27	-	18,01	4,55
28	-	9,59	3,79
29	-	14,96	5,68
30	-	19,66	8,71

При гидролизе белков творожной сыворотки показано возрастание степени гидролиза а также антиоксидантной активности при увеличении дозы ФП и продолжительности ферментации при 30 °С и 50 °С. Максимальная степень гидролиза 19,66 % зафиксирована при 50 °С, продолжительности процесса 180 мин и дозе внесения ФП 9,5%. Что касается контрольных образцов, не подвергнутых гидролизу, показано, что с увеличением температуры происходит ощутимое, практически в 2 раза снижение антиоксидантной активности, что говорит о значительном влиянии температурного фактора на этот показатель (таблица 3.11).

При оценке органолептических показателей отмечено, что явно горький привкус ощущался в образце, подвергнутом гидролизу при 30 °С при максимальной продолжительности и дозе внесения ФП, степень гидролиза при этом составила 13,06%. Однако в образце №30, полученном при максимальной температуре, продолжительности гидролиза и дозе внесения ФП горечь во вкусе не ощущалась. Это свидетельствует о том, что при данных условиях процесс идет в требуемом направлении, позволяя получить гидролизат, не имеющий в своем составе пептидов с горькими аминокислотами на конце цепи, при этом в данном образце была самая высокая степень гидролиза.

Результаты статистической оценки эффектов вариабельных факторов на степень гидролиза белков творожной сыворотки представлены в таблице 3.12. Как видно из данных таблицы 3.12 все исследуемые вариабельные факторы, за исключением квадратичного фактора продолжительности, оказывают значимое ($p<0,05$) влияние на степень гидролиза.

Таблица 3.12 - Влияние вариабельных факторов на степень гидролиза белков творожной сыворотки

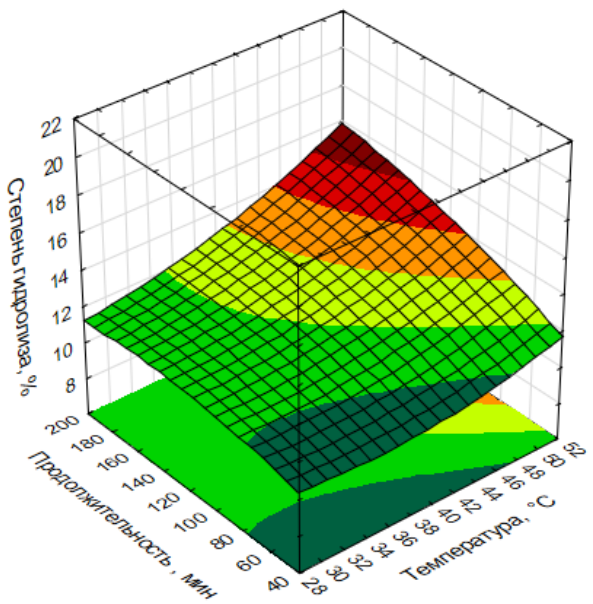
Фактор	Эффект.	Ст. откл.	t-критерий Стьюдента	p	-95, %	+95,%
	11,95086	0,098745	121,0273	0,000000	11,74253	12,15920
(1) Температура, °C (L)	2,54302	0,241874	10,5138	0,000000	2,03271	3,05333
Температура, °C (Q)	-0,51056	0,209255	-2,4399	0,025942	-0,95204	-0,06907
(2) Продолжительность, мин. (L)	1,88078	0,241874	7,7759	0,000001	1,37047	2,39109
Продолжительность, мин. (Q)	0,30944	0,209255	1,4788	0,157487	-0,13204	0,75093
(3) E/S (L)	6,68667	0,241627	27,6735	0,000000	6,17688	7,19645
E/S (Q)	0,61926	0,209685	2,9533	0,008897	0,17686	1,06166
1L by 2L	1,06167	0,295931	3,5875	0,002269	0,43731	1,68603
1L by 3L	1,97152	0,295324	6,6758	0,000004	1,34844	2,59460
2L by 3L	0,77102	0,295324	2,6108	0,018268	0,14795	1,39410

После удаления членов со статистически незначимыми регрессионными коэффициентами было получено уравнение регрессии (3.2) в кодированном виде, описывающее зависимость степени гидролиза от вариабельных факторов процесса ферментативного гидролиза УФ-концентрата творожной сыворотки:

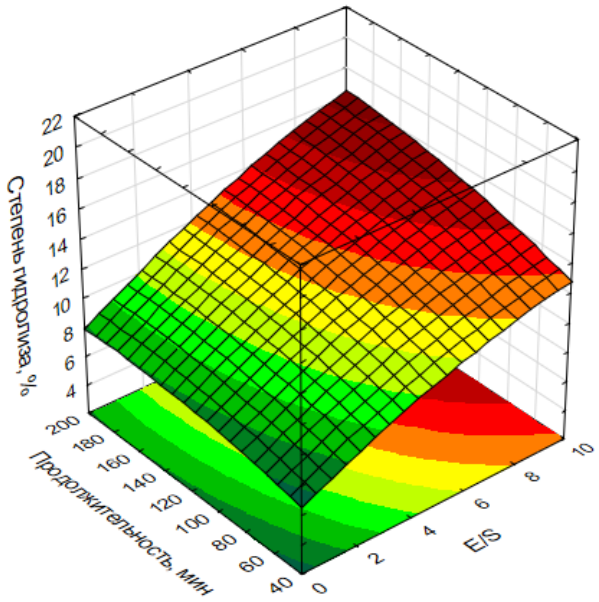
$$Y = 17{,}197 - 0{,}49699 * X_1 + 0{,}0051056 * X_1^2 - 0{,}37351 * X_2 + 0{,}053083 * X_1 * X_2 - 0{,}30944 * X_2^2 + 0{,}0050243 * X_3 + 0{,}021906 * X_1 * X_3 + 0{,}085669 * X_2 * X_3 - 0{,}030963 * X_3^2 \quad (3.2)$$

Графическая иллюстрация зависимости степени гидролиза от вариабельных параметров процесса гидролиза белков творожной сыворотки представлена на рисунке 3.6. На рисунках 3.6а, 3.6б и 3.6в не прослеживается

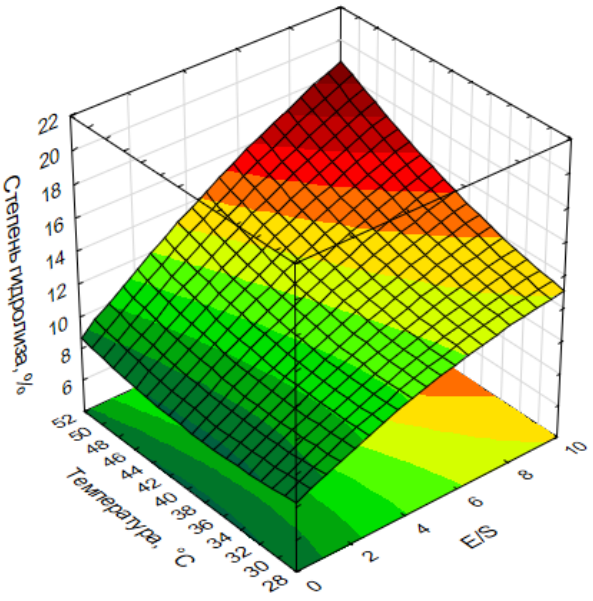
локальных максимумов и минимумов, что свидетельствует о том, что степень гидролиза творожных белков возрастает с повышением каждого из исследуемых параметров.



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;

Рисунок 3.6 – Зависимость степени гидролиза в гидролизатах УФ-концентрата творожной сыворотки от вариабельных параметров при среднем уровне третьего фактора

Результаты статистической оценки эффектов вариабельных факторов на антиоксидантную активность белков творожной сыворотки представлены в таблице 3.13. Как видно из данных таблицы 6 все исследуемые вариабельные факторы не оказывают значимое (p>0,05) влияние на антиоксидантную активность. Значимое влияние (p<0,05) оказывает лишь линейный фактор дозы вносимого ФП.

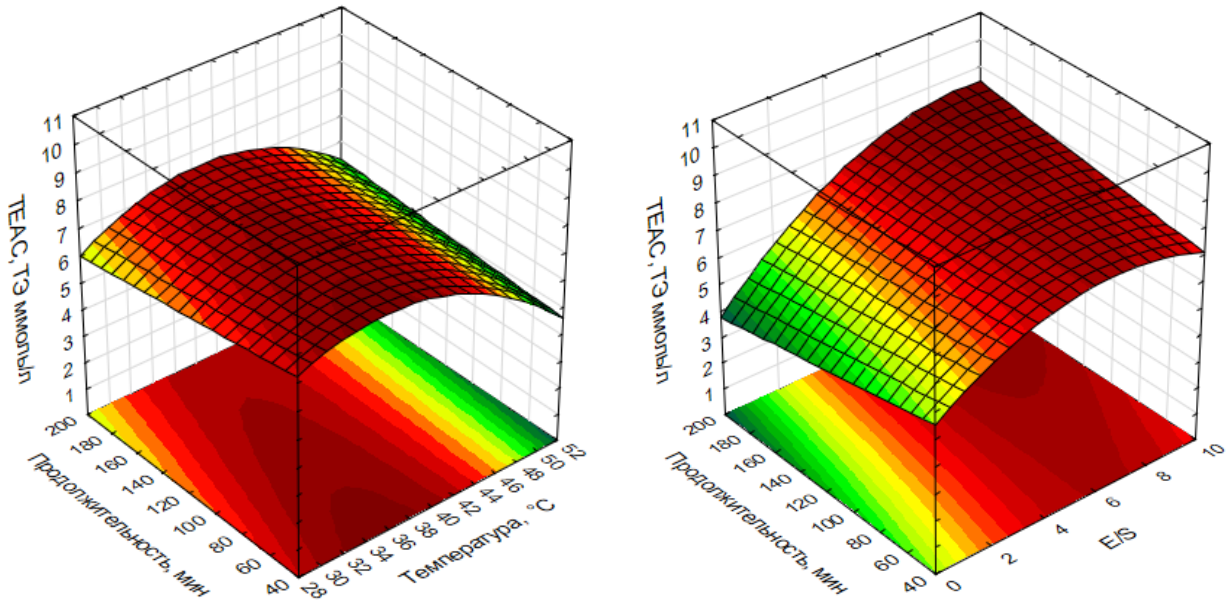
Таблица 3.13 - Влияние вариабельных факторов на антиоксидантную активность белков творожной сыворотки

Фактор	Эффект.	Ст. откл.	t-критерий Стьюдента	p	-95, %	+95,%
	6,01776	0,350932	17,14794	0,000000	5,27736	6,758159
(1) Температура, °C (L)	-1,36738	0,859600	-1,59071	0,130097	-3,18098	0,446221
Температура, °C (Q)	1,21000	0,743674	1,62706	0,122116	-0,35902	2,779015
(2) Продолжительность, мин. (L)	-0,15247	0,859600	-0,17738	0,861309	-1,96607	1,661126
Продолжительность, мин. (Q)	-0,00333	0,743674	-0,00448	0,996476	-1,57235	1,565682
(3) E/S (L)	2,81889	0,858721	3,28266	0,004391	1,00715	4,630632
E/S (Q)	1,10494	0,745203	1,48273	0,156446	-0,46730	2,677179
1L by 2L	0,60167	1,051714	0,57208	0,574754	-1,61726	2,820590
1L by 3L	-0,19918	1,049557	-0,18978	0,851732	-2,41355	2,015191
2L by 3L	1,04324	1,049557	0,99398	0,334171	-1,17113	3,257609

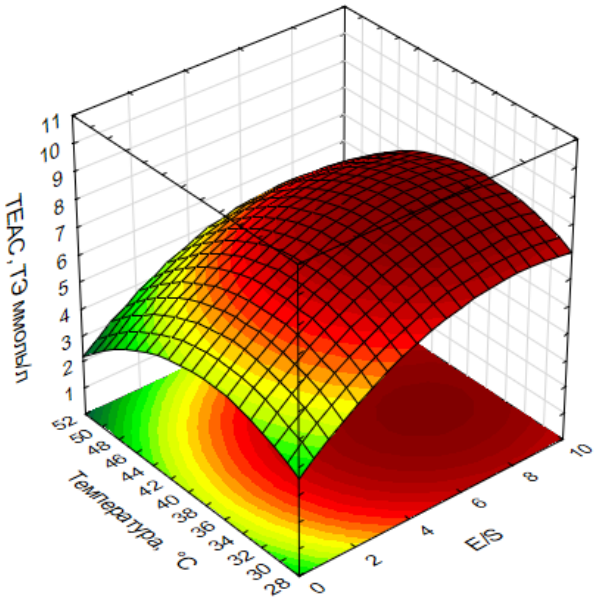
После удаления членов со статистически незначимыми регрессионными коэффициентами было получено уравнение регрессии (3) в кодированном виде описывающее зависимость антиоксидантной активности от вариабельных факторов процесса ферментативного гидролиза УФ-концентрата творожной сыворотки:

$$Y=6{,}018+1{,}409*X_3 \quad (3.3)$$

Поверхности равного отклика величины ТЕАС гидролизатов от вариабельных параметров процесса гидролиза концентрата творожной сыворотки представлены на рисунке 3.7. На рисунках 3.7а и 3.7б четко видно наличие локального максимума антиоксидантной активности.



а) б)



в)

а) Зависимость антиоксидантной активности от продолжительности и температуры процесса;

б) Зависимость антиоксидантной активности от продолжительности процесса и субстрат-ферментного соотношения;

в) Зависимость антиоксидантной активности от температуры процесса и субстрат-ферментного соотношения

Рисунок 3.7 - Зависимость антиоксидантной активности в гидролизатах УФ-концентрата творожной сыворотки от вариабельных параметров при среднем уровне третьего фактора

Для выбора оптимальных условий проведения ферментативного гидролиза УФ-концентрата творожной сыворотки ферментным препаратом продуцента *Aspergillus oryzae* были сопоставлены результаты полнофакторных экспериментов по выбранным параметрам. По результатам поэтапной статистической оценки получены оптимальные условия гидролиза творожных белков: 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%.

Представленные данные открывают новые перспективы переработки кислой творожной сыворотки с возможностью позиционирования сывороточных белков как потенциальных функциональных компонентов, обладающих повышенной антиоксидантной активностью. Показано, что придание повышенного функционалитета сывороточным белкам возможно путем проведения направленной биокаталитической конверсии.

3.3 Оценка свойств гидролизата, полученного при оптимальных условиях процесса гидролиза

На основании полученных данных с целью исследования гидролизата белков творожной сыворотки как пищевого ингредиента, потенциально обладающего функциональностью, был выработан гидролизат при оптимальных условиях процесса ферментативного гидролиза. Полученный образец был подвергнут органолептической оценке. Данные представлены в таблице 3.14.

Таблица 3.14 – Органолептическая оценка гидролизата белков творожной сыворотки

Наименование показателя	Характеристика
Внешний вид и консистенция	Однородная непрозрачная жидкость с взвешенными белковыми частицами
Цвет	Бледно-зеленый с кремовым оттенком
Вкус	Кисловатый, характерный для творожной сыворотки
Запах	Свойственный творожной сыворотке, без посторонних привкусов и запахов

Анализируя вышепредставленные данные, можно сделать вывод о том, что ферментативный гидролиз не влияет на органолептические показатели полученного гидролизата. Органолептический анализ показал, что гидролизат, полученный в ходе экспериментальных исследований по основным характеристикам аналогичен нативной творожной сыворотке и имеет привлекательный вкус и запах. К тому же следует учитывать отсутствие горького послевкусия, свойственного белковым гидролизатам.

Представляло интерес углубленное исследование гидролизата белков творожной сыворотки и УФ-концентрата, подвергаемого гидролизу.

Методом ВЭЖХ было исследовано молекулярно-массовое распределение пептидов. Результаты представлены на хроматограмме (рисунок 3.8, 3.9) и диаграмме 3.10.

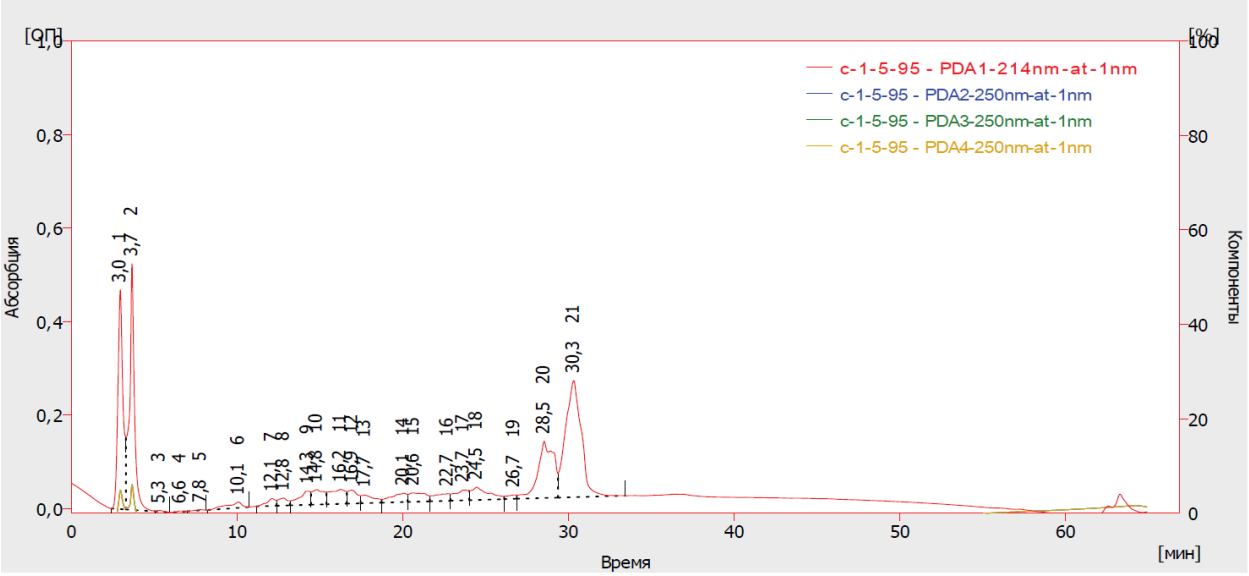


Рисунок 3.8 - Хроматограмма распределения пептидных фракций в УФ-концентрате

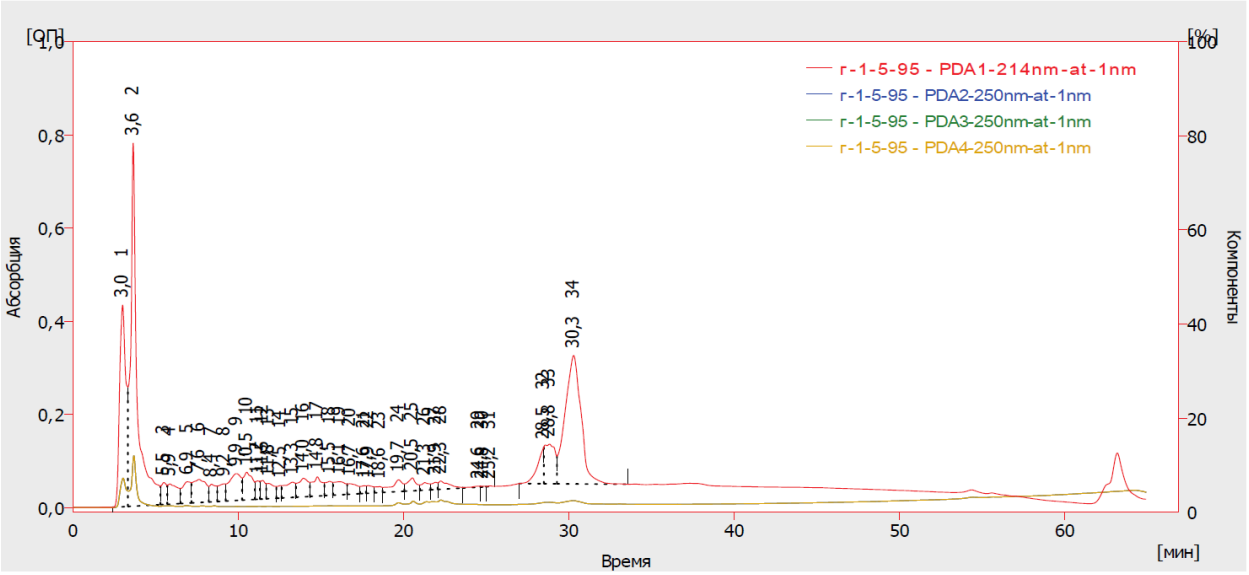
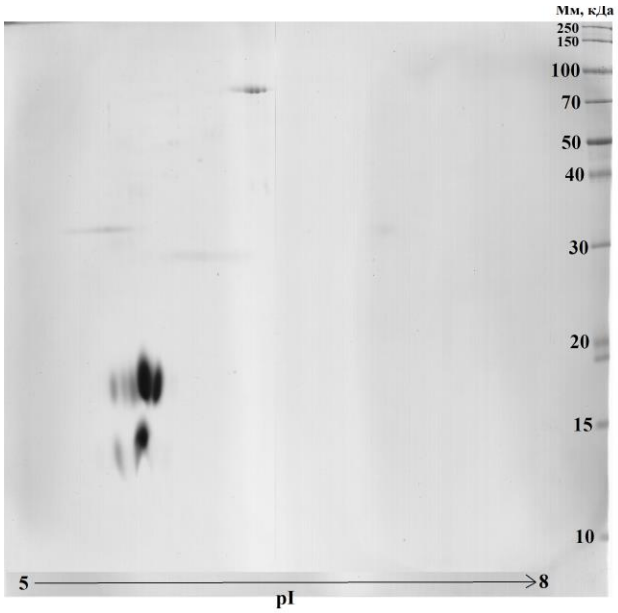
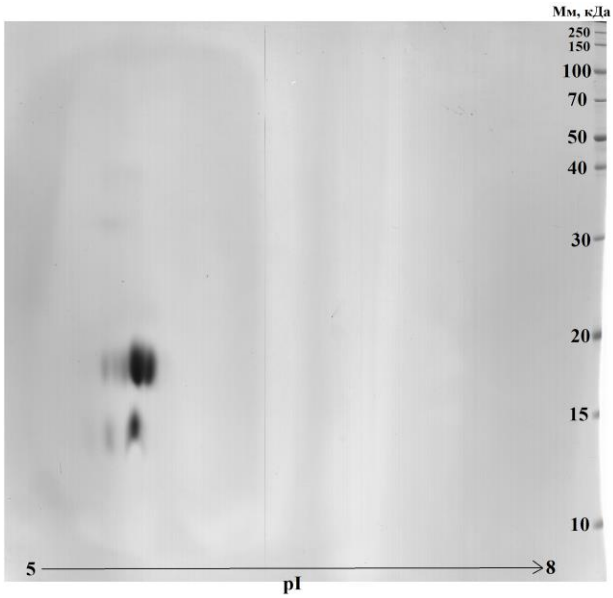
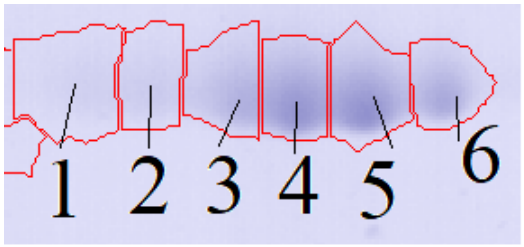
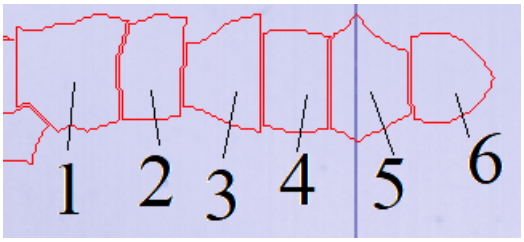
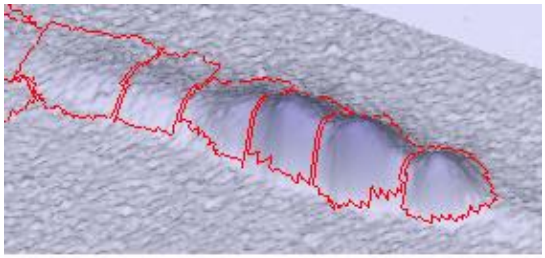
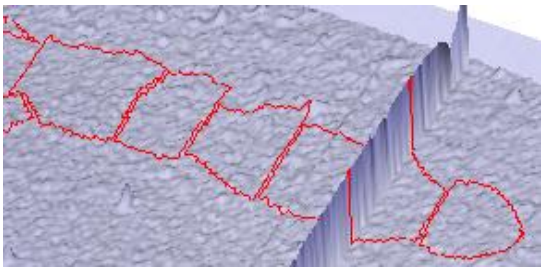


Рисунок 3.9 - Хроматограмма распределения пептидных фракций в гидролизате белков творожной сыворотки

По полученным результатам хроматографического анализа и двумерного электрофореза (рисунок 3.10), построена диаграмма (рисунок 3.11) молекулярно-массового распределения петидов УФ-концентрата и белкового гидролизата.

Концентрат белков творожной сыворотки	Гидролизат белков творожной сыворотки
	
2D 	
3D 	

2D

3D

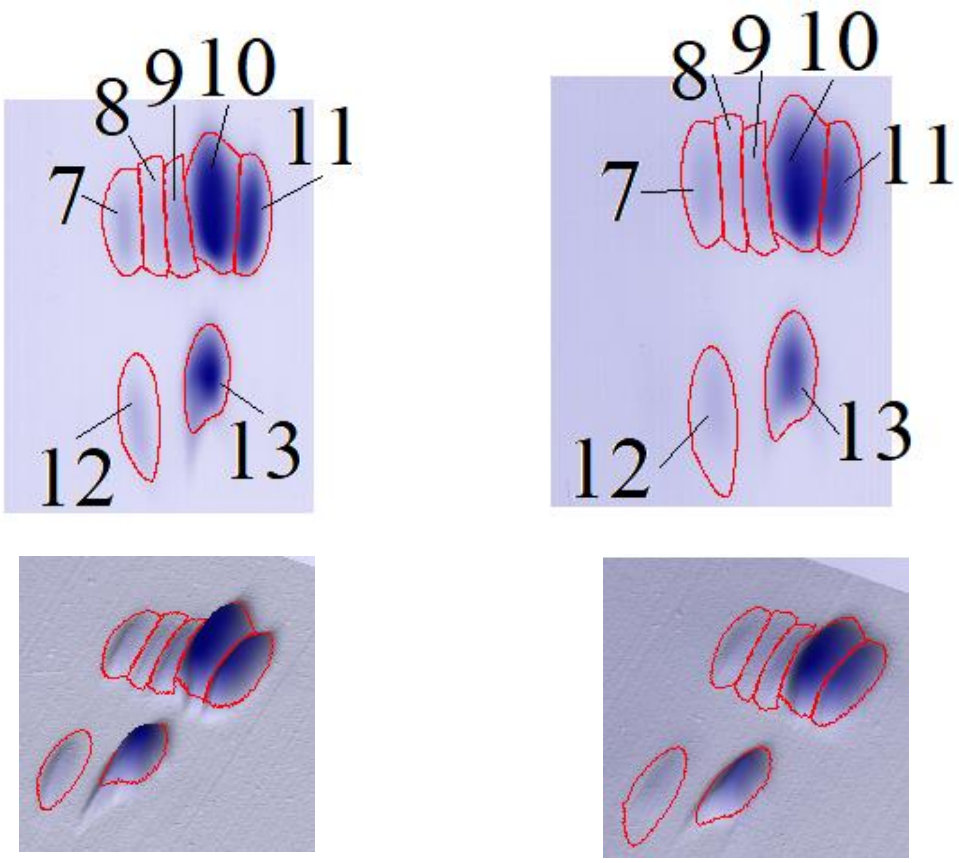


Рисунок 3.10 – Электрофореграмма белков КСБ и ГСБ

	Молочная сыворотка			Молочный гидролизат		
№ пятна	Intensity	Vol	%Vol	Intensity	Vol	%Vol
1	4308	1704063	0.400283	2030.47	821585	0.201792
2	5153	1426182	0.335009	1296.65	337299	0.0828451
3	9659	2356948	0.553646	3273.38	621078	0.152545
4	13878	3972645	0.933172	2371.49	867387	0.213042
5	15228	4819421	1.13208	17550.2	1232468	0.302711
6	11213	2410516	0.566229	1587.83	380031	0.0933409
7	29322	1,37E+08	32.1488	7516.07	18519758	4.5487
8	28545	73217032	17.1986	7702.7	15556864	3.82098
9	10373	19107450	4.48833	11979.6	24133894	5.92761
10	8694	15298315	3.59357	27899	1,32E+08	32.3638
11	14197	25356530	5.95624	22837.4	66158064	16.2493
12	10492	22211762	5.21753	7612.8	25201048	6.18972
13	30196	65531572	15.3933	24167.3	65531572	16.0954

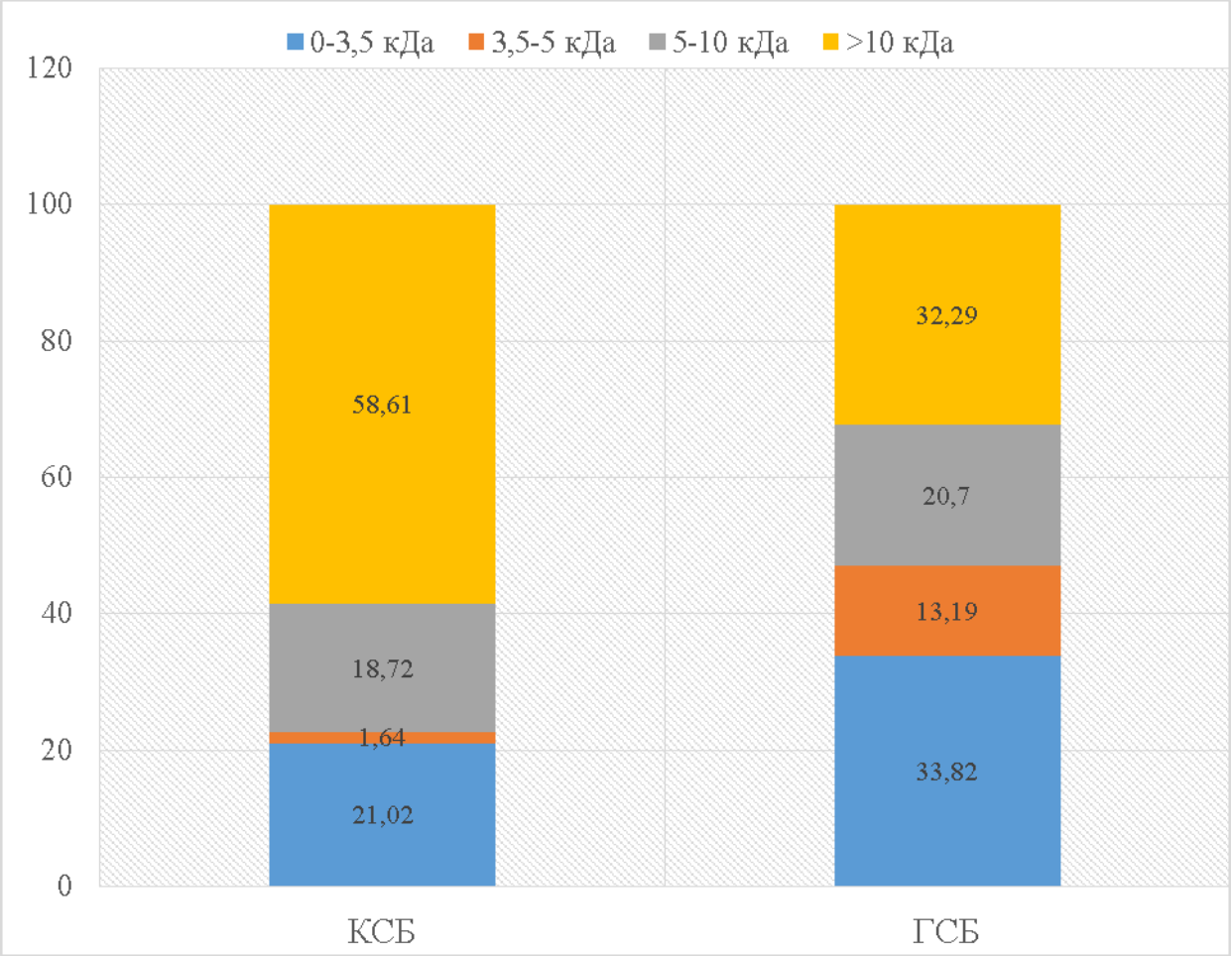


Рисунок 3.11 - Молекулярно-массовое распределение пептидных композиций

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 [65]. Таким образом, выбранные условия проведения процесса гидролиза позволяют

провести направленный биокатализ белков творожной сыворотки с получением гидролизата с заданными свойствами.

Физико-химический состав УФ-концентрата и гидролизата белков творожной сыворотки представлен в таблице 3.15.

Таблица 3.15 - Физико-химический состав КСБ и ГСБ

Наименование показателя	(± неопределенность)	Наименование образца	
		Фактические значения	
		КСБ	ГСБ
1	2	3	4
Массовая доля жира, %	(±0,10)	0,75	0,75
Массовая доля общего белка, %	(±0,06)	3,28	3,33
Содержание небелкового азота, %	(±0,004)	0,187	0,312
Массовая доля углеводов (моно и дисахаридов), % В том числе	(±16,0% относ.)	5,01	4,92
Массовая доля лактозы, %	(±16,0% относ.)	5,01	4,92

3.4 Разработка технологии творожного продукта, обогащенного гидролизатом белков творожной сыворотки

Для потенциального внедрения белковых концентратов и гидролизатов творожной сыворотки была подобрана рецептура творожного аэрированного продукта, состоящая из творога, сливок, масла сливочного и стабилизационной системы.

Гидролизат белков творожной сыворотки вырабатывался при оптимальных условиях. Режимы проведения процесса гидролиза таковы: температура процесса 46,4°С; продолжительность 180 мин, доза вносимого ФП 9,5%.

Поскольку, целью работы являлась разработка технологии творожного продукта с «аддитивным белком» творожной сыворотки, были составлены рецептуры образцов творожных продуктов с использованием КСБ и ГСБ, представленные в таблице 3.16.

В экспериментальных образцах №№ 1-10 осуществлялось внесение в рецептуру концентрата сывороточных белков, а в образцах №№ 11-20 – гидролизата.

Внесение КСБ и ГСБ осуществляли в соотношениях от 10 до 100 % с шагом 10%. Помимо экспериментальных, был приготовлен контрольный образец по исходной рецептуре. Таким образом, появилась возможность проведения 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 рецептурами, были выработаны образцы творожных продуктов по следующей технологии: составление смеси основных компонентов при температуре 20 ºС; внесение стабилизационной системы; диспергирование при температуре 40 ºС; пастеризация при температуре 80 ºС в течение 15 мин; охлаждение до температуры 20 ºС и аэрирование; фасование.

Полученные опытные образцы охлаждали до температуры (4±2) °С и выдерживали при заданной температуре в течении 2 часов с целью формирования структуры. Далее были исследованы их органолептические, структурно-механические и физико-химические характеристики.

Таблица 3.16 – Рецептуры творожных продуктов с использованием ГСБ и КСБ (в г на 100 г продукта)

№ образца	Количество компонента, г/100 г									ИТОГО
	Масло	Творог	Сливки	КСБ	ГСБ	Крахмал	Цитрат	Желатин	МДГ	
Контроль	8,0	43,9	45,0	-	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
1	8,0	43,9	40,5	4,5	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
2	8,0	43,9	36,0	9,0	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
3	8,0	43,9	31,5	13,5	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
4	8,0	43,9	27,0	18,0	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
5	8,0	43,9	22,5	22,5	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
6	8,0	43,9	18,0	27,0	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
7	8,0	43,9	13,5	31,5	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
8	8,0	43,9	9,0	36,0	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
9	8,0	43,9	4,5	40,5	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
10	8,0	43,9	-	45,0	-	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
11	8,0	43,9	40,5	-	4,5	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
12	8,0	43,9	36,0	-	9,0	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
13	8,0	43,9	31,5	-	13,5	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
14	8,0	43,9	27,0	-	18,0	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
15	8,0	43,9	22,5	-	22,5	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
16	8,0	43,9	18,0	-	27,0	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
17	8,0	43,9	13,5	-	31,5	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
18	8,0	43,9	9,0	-	36,0	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
19	8,0	43,9	4,5	-	40,5	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0
20	8,0	43,9	-	-	45,0	1,5	0,5	1,5	0,1	100,0

Органолептическая оценка

На первом этапе была проведена сравнительная оценка полученных образцов для установления влияния внесения в них КСБ и ГСБ.

Анализ органолептических показателей проводился в два этапа. На первом этапе был составлен профиль экспериментальных образцов в произвольной форме. То есть дегустаторы оценивали образцы творожного продукта, не обладая информацией о его составе. Такой подход позволил проанализировать максимально возможное количество органолептических показателей и выяснить общее впечатление от продукта.

Второй этап анкетирования дегустаторов проводился с категоризацией органолептических показателей по основным группам: вкус, запах, внешний вид и консистенция, цвет. Дегустационной комиссии были представлены данные об образцах, в том числе в каких соотношениях проводилась замена сливок на КСБ и ГСБ. Данный этап органолептической оценки проводился с применением методологии "дуо-трио", суть которого заключается в сравнении экспериментальных образцов с контрольным (эталоном). Контрольная проба представлялась дегустаторам первой, далее оценивались экспериментальные образцы. Кроме того оценивались общие впечатления от продукта и указывались наиболее отличительные признаки (приятные или отталкивающие) в сравнении с контрольным образцом.

Такой дегустационный подход позволил определить основные дескрипторы с целью составления корректного органолептического профиля в полном объеме. Идентифицированные дескрипторы представлены в таблице 3.17

Таблица 3.17. – 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. Предложенная бальная система применима для всех категорий органолептических показателей и представлена в таблице 3.18.

Таблица 3.18 – Градация основных органолептических показателей

Градация	Балл	Качество	Характеристика			
			Консистенция	Вкус	Запах	Послевкусие
5	5	Отличное	Плотная, однородная, пастообразная, нежная	Насыщенный кисломолочный, сливочный, сладковатый	Чистый кисломолочный, сливочный	Чистое сливочное с нежной кислинкой
4	4	Хорошее	Слегка мажущаяся, однородная, пастообразная, нежная	Кисломолочный, сливочный, с небольшой кислинкой	Чистый кисломолочный с небольшим кисловатым оттенком	Сливочное с умеренной кислинкой
3	3	Удовлетворительное	Мажущаяся, однородная	Нехарактерный для творожного продукта	Кисломолочный с характерным кисловатым оттенком	Выраженное кисловатое

Таким образом, с применением разработанной бальной системы интерпретированы результаты органолептического анализа выработанных экспериментальных образцов творожных продуктов.

Оценка органолептических показателей творожного продукта с КСБ

Первыми оценивались образцы, выработанные с использованием КСБ. Данные представлены на рисунке 3.12.

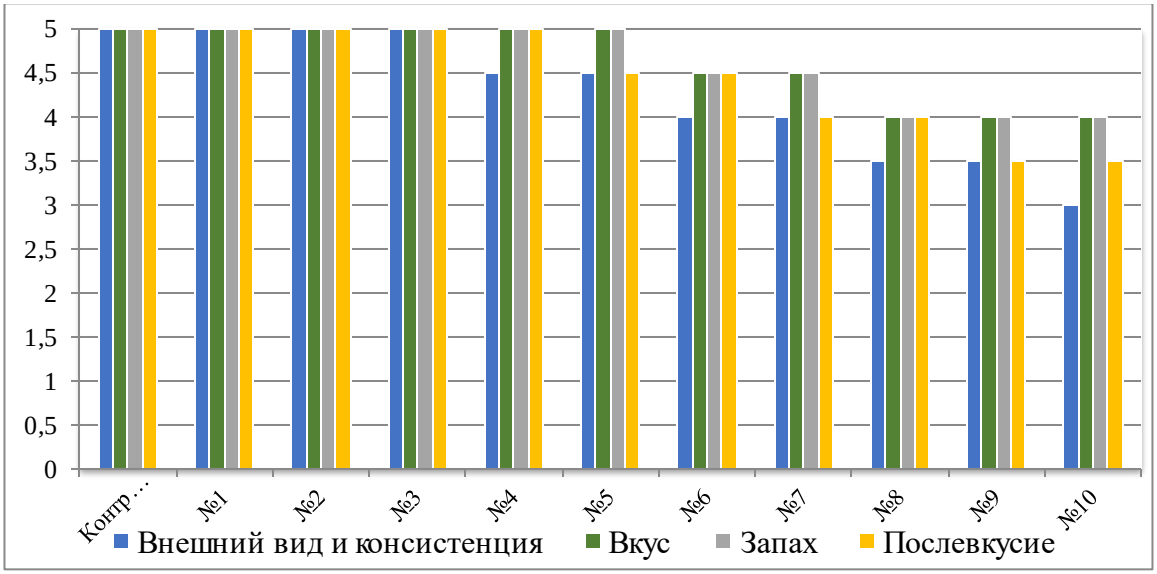


Рисунок 3.12 – Органолептический профиль экспериментальных образцов творожных продуктов с КСБ

Из выше представленных данных видно, что с увеличением количества внесеннного КСБ в творожный продукт изменения претерпевали все органолептические характеристики. По внешнему виду все приготовленные образцы имели гомогенную пастообразную консистенцию. Начиная с 6 образца, с увеличением вносимого в рецептуру КСБ, консистенция образцов имела наиболее выраженные мажущиеся признаки. Наиболее текучую консистенцию имел образец №10 со 100% КСБ.

По вкусовым характеристикам в образцах, где присутствовал КСБ в соотношении от 10% до 50% (№№ 1 – 5) отмечался насыщенный кисломолочный вкус с оттенками сладко-сливочного, характерного вносимым сливкам и сливочному маслу. Как и в случае с консистенцией, по

мере увеличения дозы вносимого КСБ интенсивность сливочных нот уменьшалась в сторону выраженной кислинки в послевкусии (№№ 6 – 10), свойственной творожной сыворотке.

Аналогичная ситуация была отмечена при оценке запаха экспериментальных образцов. Кисловатые оттенки начали проявляться с образца №6 и максимальная интенсивность данной характеристики была отмечена в образце №10.

Существенных изменений в цветовых характеристиках не выявлено. Отмечен плавный переход от желтоватого к белому. Начиная с образца №7 цвет полностью белый. Изменение цвета экспериментальных образцов никак не повлиял на общее впечатление от продукта.

Стоит отметить, что ни один из экспериментальных образцов не получил удовлетворительную отметку, кроме образца №10 (3 балла за консистенцию). Исходя из этого, можно сделать вывод, что присутствие КСБ в рецептуре, не оказывает существенного влияния на органолептические показатели готового продукта.

Опираясь на полученные данные, можно рекомендовать внесение КСБ в рецептуру творожного продукта в соотношении 50% (образец №5). Данный образец обладает гармоничных вкусом и запахом и плотной пастообразной консистенцией.

Оценка органолептических показателей творожного продукта с ГСБ

Проведено исследование органолептических показателей экспериментальных образцов творожных продуктов, выработанных с использованием ГСБ. Данные представлены на рисунке 3.13.

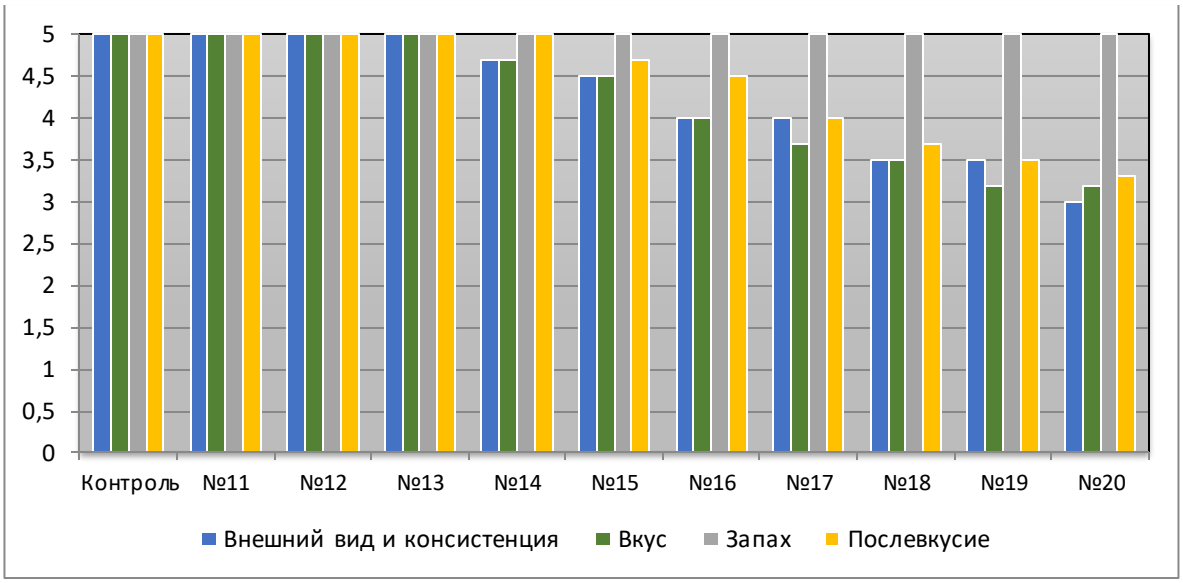


Рисунок 3.13 – Органолептический профиль экспериментальных образцов творожных продуктов с ГСБ

Опираясь на данные диаграммы органолептических показателей творожных продуктов видно, что, как и в случае с образцами № 1 – 10, изменение консистенции зависит от количества ГСБ, вносимого в рецептуру продукта. Образцы творожных продуктов с ГСБ в соотношении от 10% до 40% (№№ 11 – 14) имели плотную однородную консистенцию. По мере увеличения дозы внесения ГСБ наблюдались характерные признаки текучести образцов. Наименее плотная консистенция отмечена в образцах №18 – 20.

Изменение вкусовых характеристик отмечено в образцах, начиная с №15. У исследуемых образцов наблюдался слабовыраженный привкус не характерный для творожного продукта. С увеличением процента замены внесения ГСБ нехарактерный привкус усиливался. К тому же в образцах №16 – 20 отмечено нарастание достаточно продолжительного кисловатого послевкусия. Наиболее привлекательные и сбалансированные вкусовые характеристики отмечены в образце №14. Данный образец имел ярко выраженный кисломолочный вкус, с приятной кислинкой в послевкусии.

Динамика цветовых характеристик аналогична, как и в случае применения КСБ в рецептуре творожных продуктов.

Анализируя данные органолептической оценки образцов №№ 11 – 20, можно сделать вывод о том, что рекомендуемая доза внесения ГСБ составляет 40% (образец № 14).

Исследование микробиологических показателей

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) ºС на 15 суток, в течение этого времени проводили микробиологические исследования по следующим показателям: отсутствие БГКП в 1 г, 0,1 г и 0,01 г; количество дрожжей и плесеней в 1 г.

Согласно графику, микробиологическое исследование проводили на фоновой точке, затем через 1, 3, 7, 10 и 15 суток.

В течение всего исследования БГКП не были обнаружены во всех исследуемых объемах во всех образцах.

Результаты исследования дрожжей и плесеней представлены на диаграммах 3.14 – 3.15.

Как видно из представленных данных (рисунок 3.14), до 7 суток рост дрожжей и плесеней не был отмечен, затем произошел скачок роста дрожжей в образцах № 1, 2, 11, 12, 13. К моменту окончания исследования дрожжи не были обнаружены в образцах с 3 по 10 и с 14 по 20. В остальных образцах было зафиксировано наличие дрожжей, в том числе в образцах № 1, 2, 11, 12, 13 отмечено значительное превышение.

Проведенное параллельно с этим исследование количества плесеней в образцах (рисунок 3.15) оказало, что, как и в случае с дрожжами, все образцы сохраняли микробиологическую чистоту в отношении искомого микроорганизма до 7 суток, после чего был отмечен рост плесеней в отдельных образцах. К моменту окончания эксперимента количество плесеней превысило допустимый порог в образцах № 3, 4 и 11. Также плесени обнаружены в контрольном образце и образце №1.

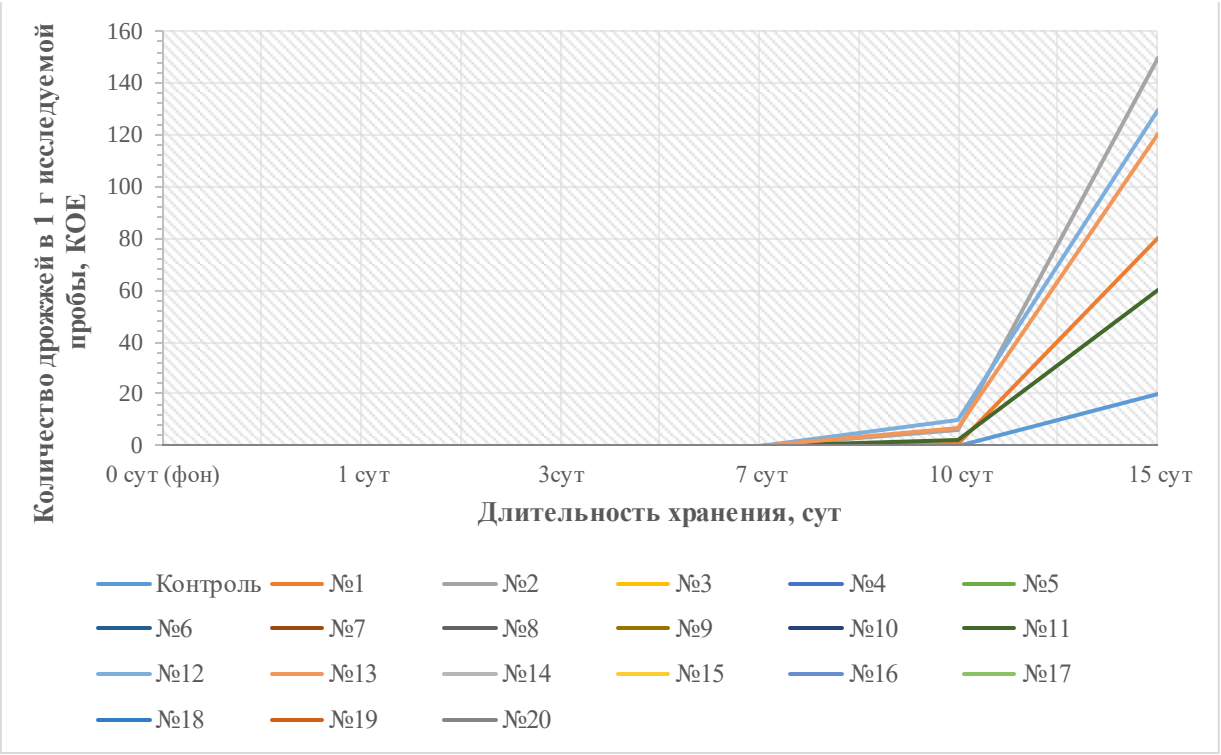


Рисунок 3.14. – Содержание дрожжей в экспериментальных образцах в процессе хранения

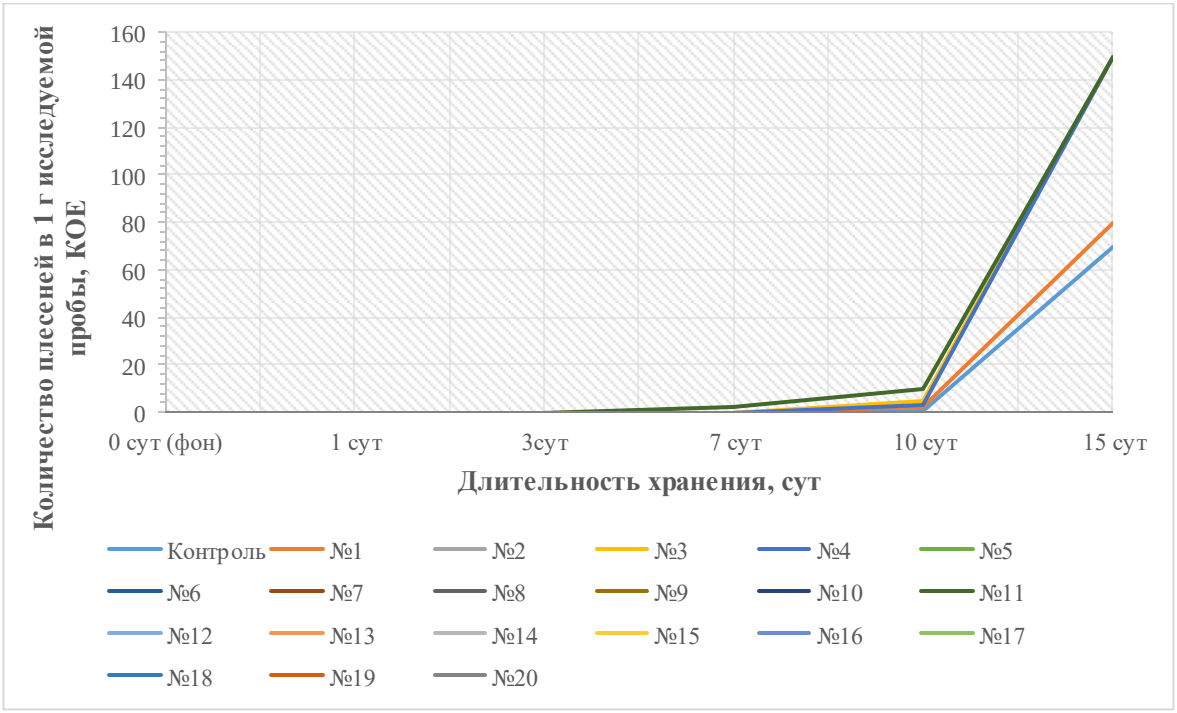


Рисунок 3.15. – Содержание плесеней в экспериментальных образцах в процессе хранения

Резюмируя вышесказанное, стоит сделать вывод о том, что предъявляемым к образцам творожных продуктов с применением

концентрата и гидролизата сывороточных белков требованиям соответствовали образцы №№ 5-10 и 14-20. Для них рекомендован срок хранения 11 суток при температуре (4±2) ºС и относительной влажности не более 75%. Внесение гидролизата белков творожной сыворотки положительно влияет на микробиологическую безопасность продукта. Это, возможно, обусловлено наличием антимикробных пептидов, ингибирующих рост патогенной микрофлоры, вызывающей порчу продуктов.

Для контрольного образца и образцов №№ 1-4,11-13 рекомендован срок хранения 5 суток при температуре (4±2) ºС и относительной влажности не более 75%.

Исследование физико-химических и структурно-механических характеристик экспериментальных образцов

В соответствии с поставленными задачами, оценивали зависимость значений активной кислотности готовых образцов творожных продуктов от дозы внесения КСБ и ГСБ. Данные представлены на рисунке 3.16.

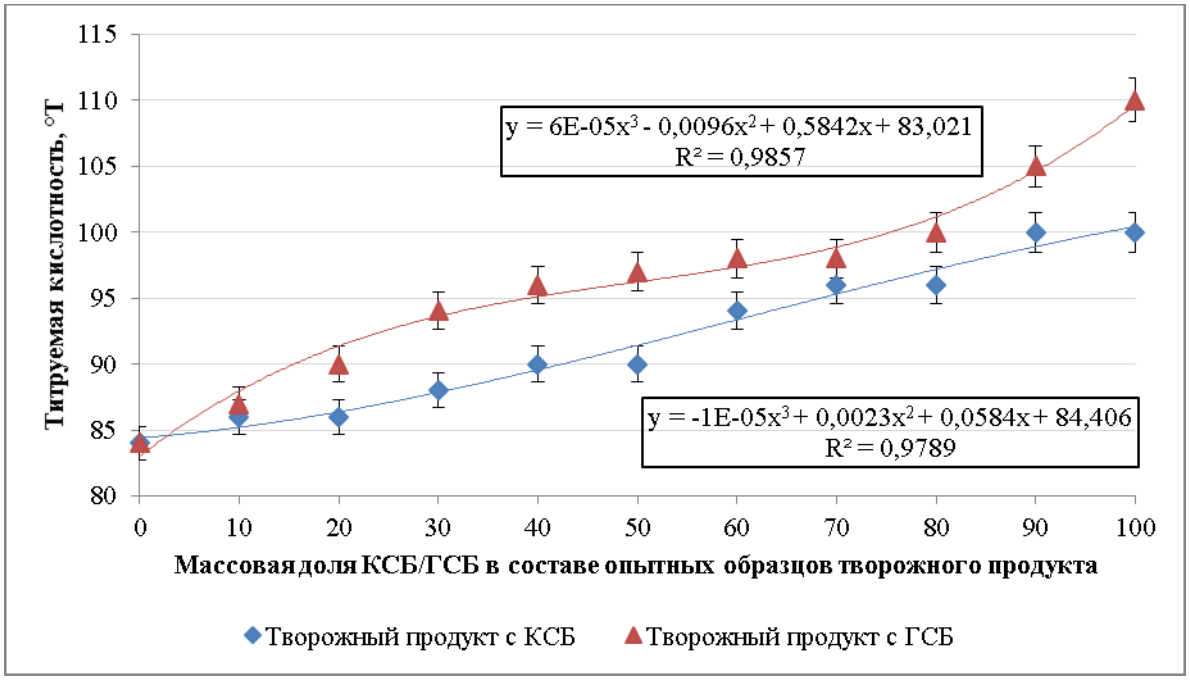


Рисунок 3.16 – Зависимость титруемой кислотности от массовой доли КСБ/ГСБ в экспериментальных образцах

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 по отношению к контрольному образцу составляет 16 ºТ при массовой доли КСБ в продукте 100% (образец №10) и 24 ºТ при 100% ГСБ (образец №20). В среднем повышение титруемой кислотности происходило на 2 – 4 ºТ. Стоит отметить, что полученные данные коррелируют с данными органолептической оценки выработанных образцов творожных продуктов.

Структурно-механические характеристики творожных продуктов с КСБ

Данные структурно-механических характеристик выработанных образцов творожных продуктов с концентратом белков творожной сыворотки представлены на рисунках 3.17, 3.18. На основании данных, полученных в ходе исследований, построены кривые течения образцов и петли гистерезиса, необходимые для количественного определения тиксотропности творожных продуктов. Исходя из этого, рассчитывалась площадь петли гистерезиса как определенный интеграл разности функций прямого и обратного хода кривых кинетики деформации. Таким образом, чем меньше площадь петли гистерезиса, тем ниже выражена тиксотропность, характеризующая наиболее стабильные структурно-механические свойства.

Поскольку значительная часть технологических операций при производстве эмульсионных продуктов сопровождается созданием или разрушением структуры, эти свойства являются определяющими и, непременно должны учитываться, при разработке новых пищевых эмульсий. Высокие тиксотропные свойства продукта сохраняют устойчивость эмульсионной системы и ее консистенции, предупреждая расслоение продукта.

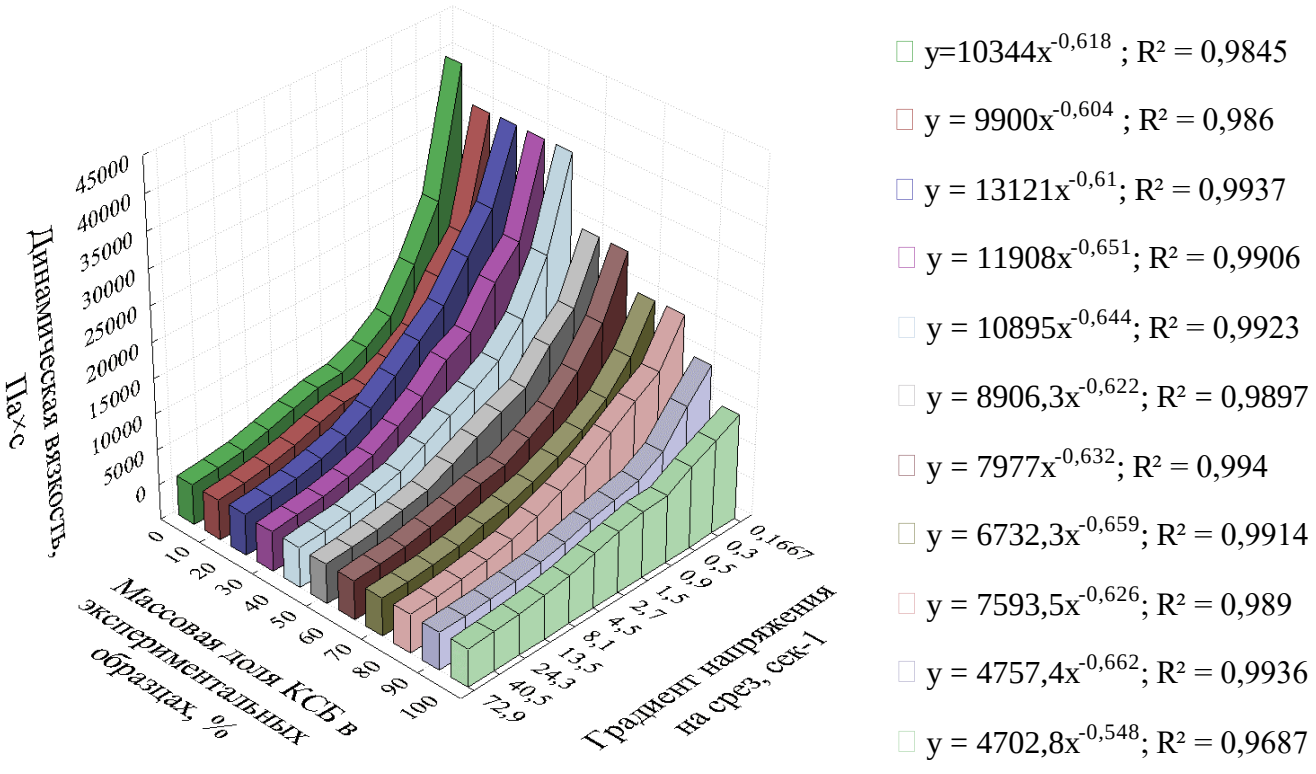


Рисунок 3.17 – Структурно-механические характеристики творожных продуктов с различным содержанием КСБ

Рисунок 3.18 – Тиксотропные свойства творожных продуктов с различным содержанием КСБ

Анализ кривых течения экспериментальных образцов творожных продуктов (рисунок 3.17) показал, что полученные зависимости носят степенной характер. По мере увеличения градиента напряжения на срез (скорости деформации) вязкость контрольного образца и образцов с содержанием КСБ в диапазоне от 10 до 40%, при скоростях деформации 0,1667 – 0,9 $с^{-1}$ значительно превышала вязкость остальных. При этом с увеличением массовой доли КСБ в продукте изменение вязкостных характеристик происходило незначительно. Начиная с образца с содержанием КСБ 50% и более, отмечено резкое уменьшение начальной вязкости. Снижение вязкости всех экспериментальных образцов в интервале градиента напряжения на срез 1,5 – 13,5 $с^{-1}$ происходило постепенно и равномерно. С ростом градиента напряжения на срез выше 13,5 $с^{-1}$ происходил переход к более медленному изменению значений вязкости и выход кривой кинетики деформации на «плато». Высокие тиксотропные свойства (рисунок 3.18) по сравнению с контрольным образцом отмечены в образцах творожных продуктов с массовой долей КСБ 20 – 60%. Из них наилучшим показателем тиксотропности обладал образец, в котором содержание концентрата сывороточных белков составляло 50% (образец №5). Образцы с массовой долей КСБ 70%, 80% и 90% проявили себя как наименее устойчивые эмульсионные системы. Творожный продукт со 100%-ным концентратом белков творожной сыворотки также имел неплохие тиксотропные свойства, но низкие вязкостные характеристики.

Структурно-механические характеристики творожных продуктов с ГСБ

Исследование структурно-механических характеристик опытных образцов творожных продуктов с применением ГСБ (рисунок 3.19, 3.20) 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 $с^{-1}$).

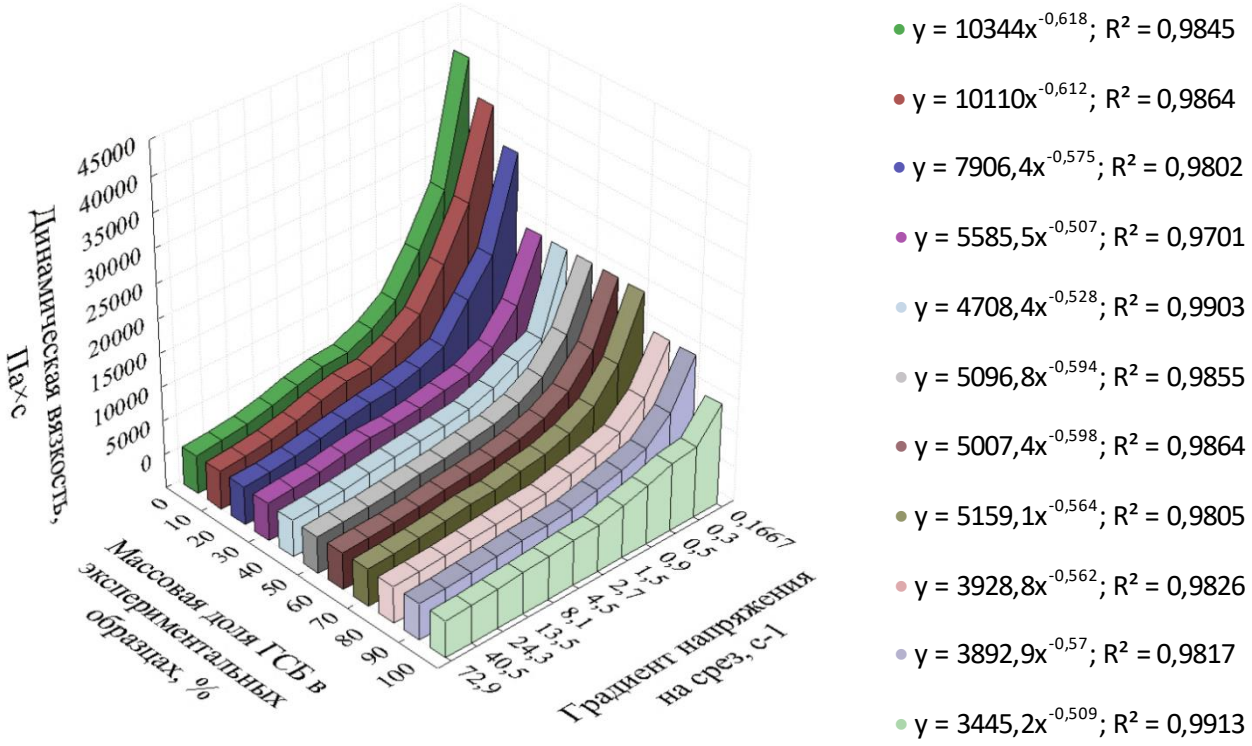


Рисунок 3.19 – Структурно-механические характеристики творожных продуктов с различным содержанием ГСБ

Рисунок 3.20 – Тиксотропные свойства творожных продуктов с различным содержанием ГСБ

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 скоростях деформации (более 8.1 $с^{-1}$).При анализе тиксотропных свойств творожных продуктов с ГСБ (рисунок 3.20) 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%.

Таким образом, проанализировав совокупность полученных данных (органолептические, физико-химические, структурно-механические свойства), было принято решение продолжить разработку творожного продукта на основе экспериментальных образцов с содержанием 50 % КСБ (образец №5) и 40% ГСБ (образец №14).

Обоснование технологических режимов производства творожного продукта

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.

Для диспергирования и аэрирования был использован гидродинамический измельчитель-диспергатор ГИД-100/1, который предназначен для производства продуктов с использованием газонаполнения.

Приготовление образцов продуктов осуществляли по рецептуре (табл.3.19) в следующей последовательности: составление смеси основных компонентов; внесение стабилизационной системы; диспергирование;

пастеризация; охлаждение, аэрирование, фасование.

Таблица 3.19 – Рецептура творожного продукта с использованием ГСБ, г/1000г

Наименование компонента	Количество, г
Творог	439,0
Сливки	270,0
Масло сливочное	80,0
Гидролизат белков творожной сыворотки	180,0
Стабилизационная система	36,0
ИТОГО	1000,0

Для получения наиболее стойкой аэрированной системы на первом этапе осуществляли подбор режимов диспергирования с учетом разности плотностей гидролизата и сливок. Ранее подобранные режимы также потребовали корректировки из-за достаточно большого процента внесения гидролизата – 40 %. Был проведен ряд экспериментов, в которых входными параметрами служили количество оборотов, температура и продолжительность проведения процесса; выходным параметром – степень синерезиса. Полученные данные представлены в таблице 3.20 и на рисунке 3.21.

Таблица 3.20 – Степень синерезиса эмульсионной системы в зависимости от частоты вращения ротора, температуры и продолжительности

№ образца	Продолжительность диспергирования, мин	Частота вращения ротора, об/мин	Температура, °С	$С_{син}$, %
1	3	600	35	19,0
2	3	800	40	9,0
3	3	1000	45	12,0
4	4	600	35	5,0
5	4	800	40	4,0
6	4	1000	45	8,0
7	5	600	35	5,0
8	5	800	40	3,0
9	5	1000	45	5,0

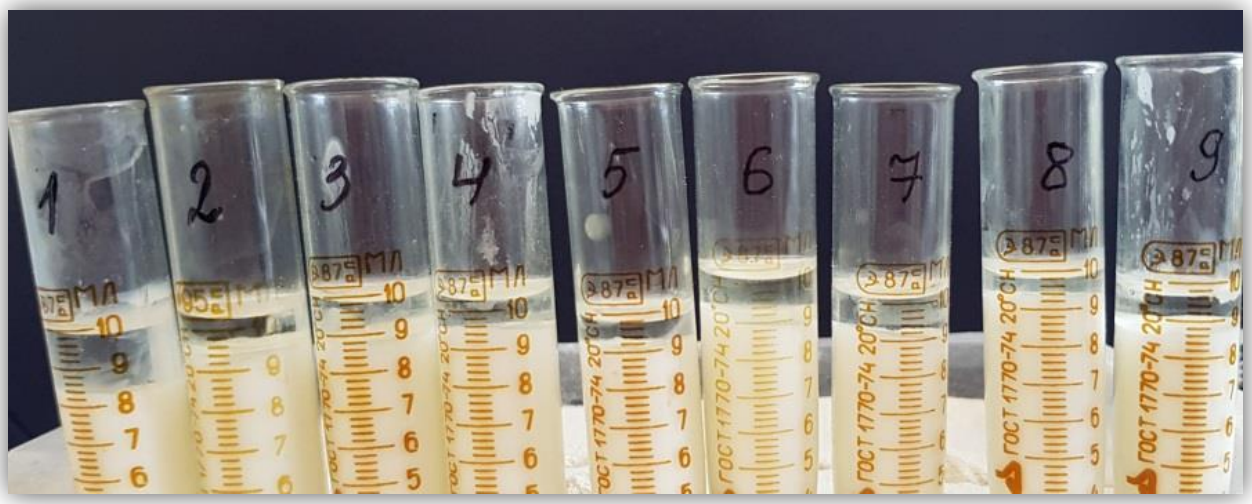


Рисунок 3.21 – Степень синерезиса эмульсионной системы в зависимости от исследуемых параметров

Как видно из представленных данных, и продолжительность, и частота вращения, и температура в значительной степени оказывают влияние на стойкость полученной эмульсии. При этом наилучшими показателями обладал образец, подвергнутый диспергированию при температуре 40 ºС с частотой вращения ротора 800 об/мин в течение 5 минут. Данные режимы и легли в основу технологической схемы.

Следующей немаловажной технологической операцией является пастеризация продукта, оказывающей значительное влияние на хранимоспособность продукта. При проведении экспериментов по тепловой обработке полученной белковой эмульсии были исследованы три температурных режима: 75, 80 и 85 ºС с выдержкой 3 и 5 минут. Визуально оценивали образование белковых агрегатов, свидетельствующих о коагуляции белков. Полученные результаты показали, что свертывание белка начинает происходить при температуре 85 °С с выдержкой 3 мин, при дальнейшей выдержке этот процесс интенсифицируется. При проведении тепловой обработки при 80 ºС и выдержке 5 мин система полностью сохраняет свою текстуру, следовательно, этот режим и был рекомендован для

включения в технологическую схему.

Следующим немаловажным этапом является охлаждение продукта после пастеризации перед проведением непосредственно аэрирования. На данном этапе оценивали степень взбитости продукта после охлаждения. Для адекватной оценки способности полученной системы к пенообразованию, аэрирование проводили при прочих равных условиях и продолжительности 5 минут. Данные эксперимента показали достаточно высокую пенообразующую способность системы, при этом при увеличении температуры до 16 °С не происходило падения пены и она находилась на уровне 80%. Это позволило рекомендовать указанную температуру на этапе подготовки продукта к газонаполнению, хотя она достаточно высока по сравнению с традиционно используемой (7-10°С), что позволит значительно снизить энергозатраты на производство продукта.

Далее были исследованы непосредственно параметры газонаполнения. Отправной точкой при этом является не только достижение максимальной взбитости, но и равномерное распределения азота в эмульсии, как фактор, оказывающий влияние на стабильность текстуры в хранении. На первом этапе исследовано влияние величины зазора ротор/статор аппарата ГИД 100/1 (n). Данный параметр варьировали от 0,1 до 1,5 мм. Данный эксперимент показал, что наилучшими показатели зафиксированы при минимальном межцилиндровом зазоре – 0,1 мм: пузырьки газа имели средний диаметр 1 мм и равномерное распределение по объему продукта. С увеличением зазора ротор/статор происходило укрупнение пузырьков азота, максимальное значение зафиксировано на уровне 4 мм. Далее при установленной величине зазора 0,1 мм были исследованы пенообразующие характеристики эмульсионной системы, а именно степень взбитости, в зависимости от частоты вращения ротора и продолжительности газонаполнения. Результаты представлены в таблице 3.21

Таблица 3.21 – Пенообразующие свойства эмульсионного продукта в зависимости от параметров газонаполнения

№ образца	Продолжительность газонаполнения, мин	Частота вращения ротора, об/мин	Взбитость, %
1	1	800	43,2
2	1	1000	44,0
3	1	1200	46,0
4	3	800	42,8
5	3	1200	64,0
6	3	1500	59,3
7	5	800	58,8
8	5	1200	75,3
9	5	1500	57,0

Как видно из данных таблицы 3.21, с увеличением количества оборотов свыше 1200 об/мин происходит падение степени взбитости, что, по-видимому, связано с уплотнением структуры в результате механического воздействия, в то время как увеличение продолжительности газонаполнения приводит к улучшению пенообразующих характеристик. Таким образом, наиболее рациональными параметрами газонаполения можно считать: продолжительность процесса 5 мин при частоте вращения ротора 1200 об/мин.

По результатам комплексных исследований разработана принципиальная технологическая схема получения эмульсионного аэрированного продукта с гидролизатом сывороточных белков, представленная на рисунке 3.22.

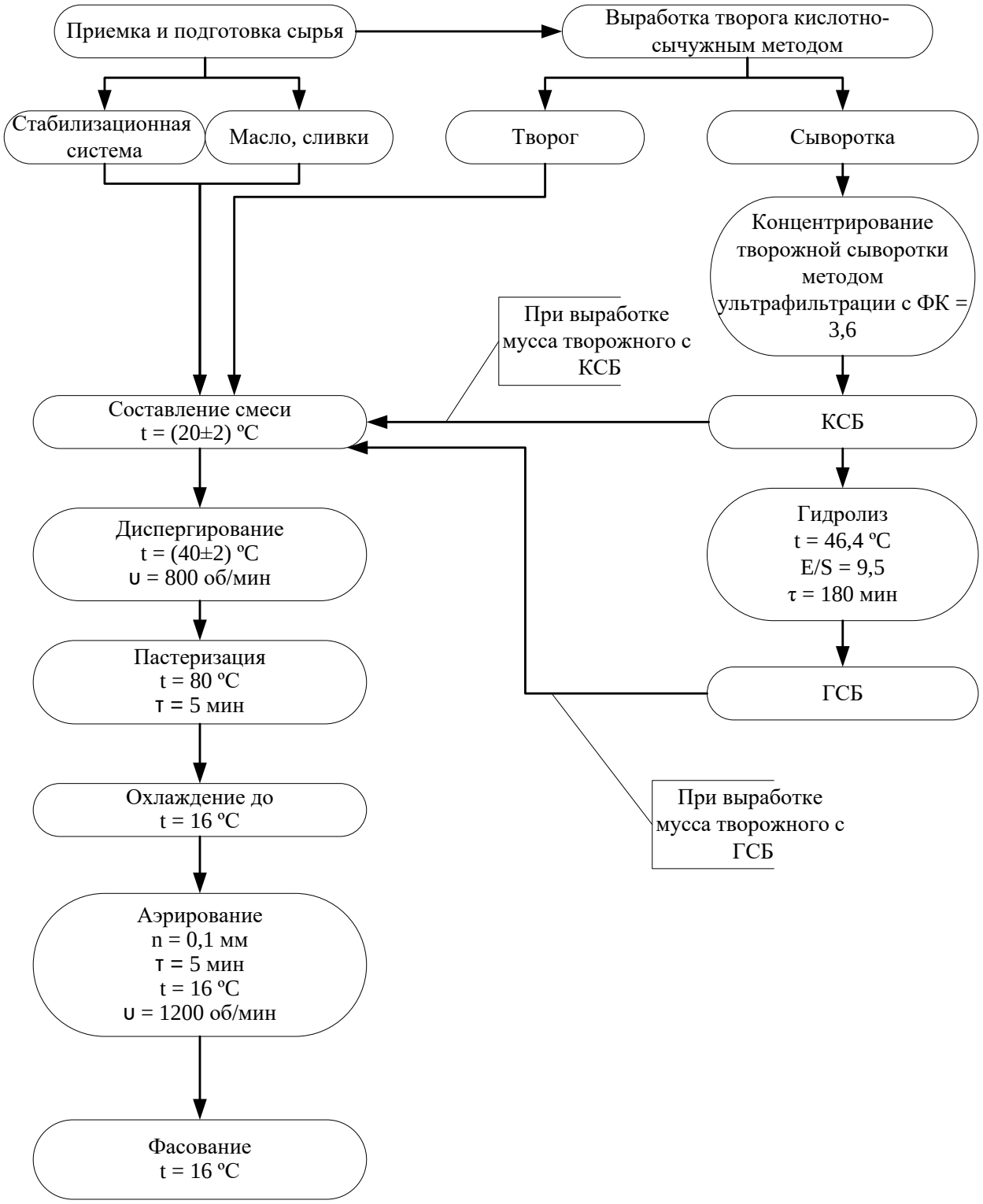


Рисунок 3.22 – Принципиальная технологическая схема получения творожного аэрированного продукта с гидролизатом сывороточных белков.

Проведенные исследования по разработке технологии аэрированного творожного продукта с использованием ранее выработанного и исследованного гидролизата белков творожной сыворотки показали

необходимость корректировки традиционных режимов получения аэрированных продуктов при замене в рецептуре сливок на гидролизат.

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.

3.5 Комплексное исследование свойств творожного продукта

Определение пищевой, биологической и энергетической ценности разработанного творожного продукта

С целью комплексного изучения свойств разработанного продукта, проведена экспериментальная выработка творожного продукта по разработанной технологии на предыдущем этапе. Были проведены исследования, направленные на изучение биологической и энергетической ценности экспериментального образца в сравнении с контрольным (таблица 3.22.). Для идентификации образцов им были присвоены условные обозначения:

- Тв-К – образец творожного продукта, выработанного по разработанной рецептуре (контроль);
- Тв-ГСБ40 – образец творожного продукта с массовой долей ГСБ 40%.

Таблица 3.22 – 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 энергетическую ценность продукта 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 (рисунок 3.23) 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).

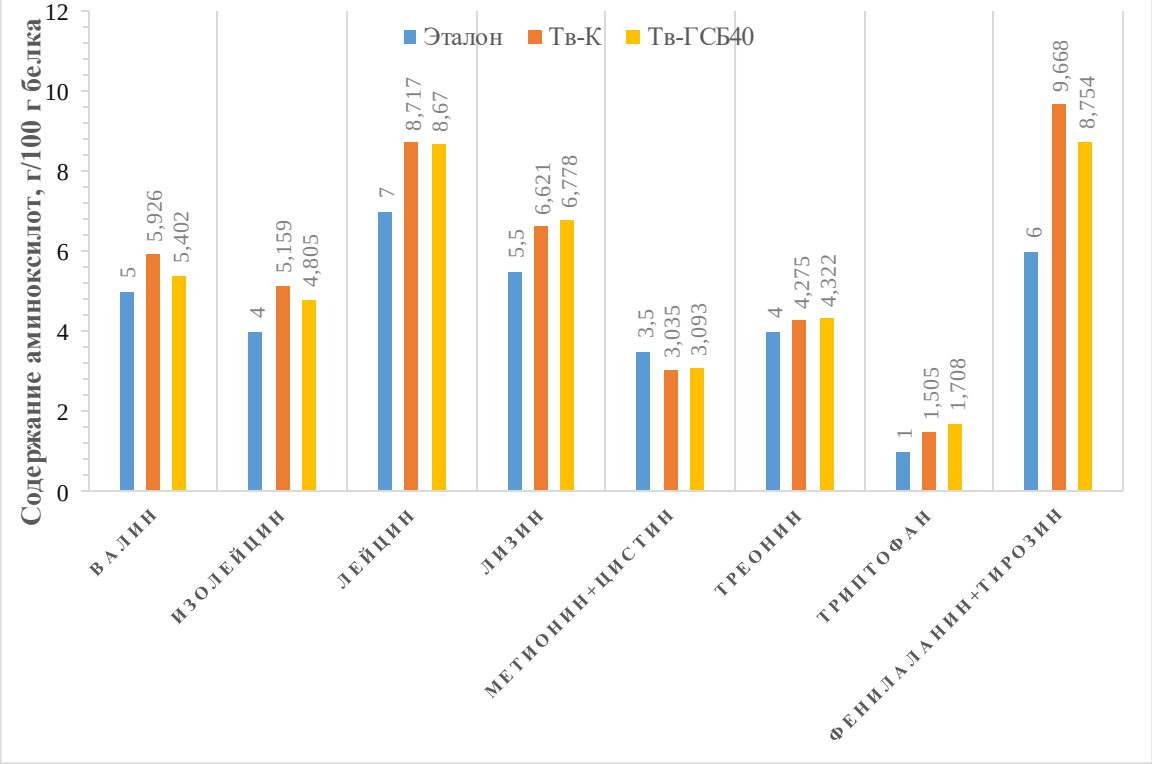


Рисунок 3.23 – Аминокислотный состав экспериментальных образцов творожных продуктов

Стоит отметить, что введение белков творожной сыворотки в рецептуру продукта позволило незначительно увеличить коэффициент утилитарности и снизить показатель сопоставимой избыточности (рисунок 3.23). При этом модификация сывороточных белков при помощи

ферментативного гидролиза (рисунок 3.24) также 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.

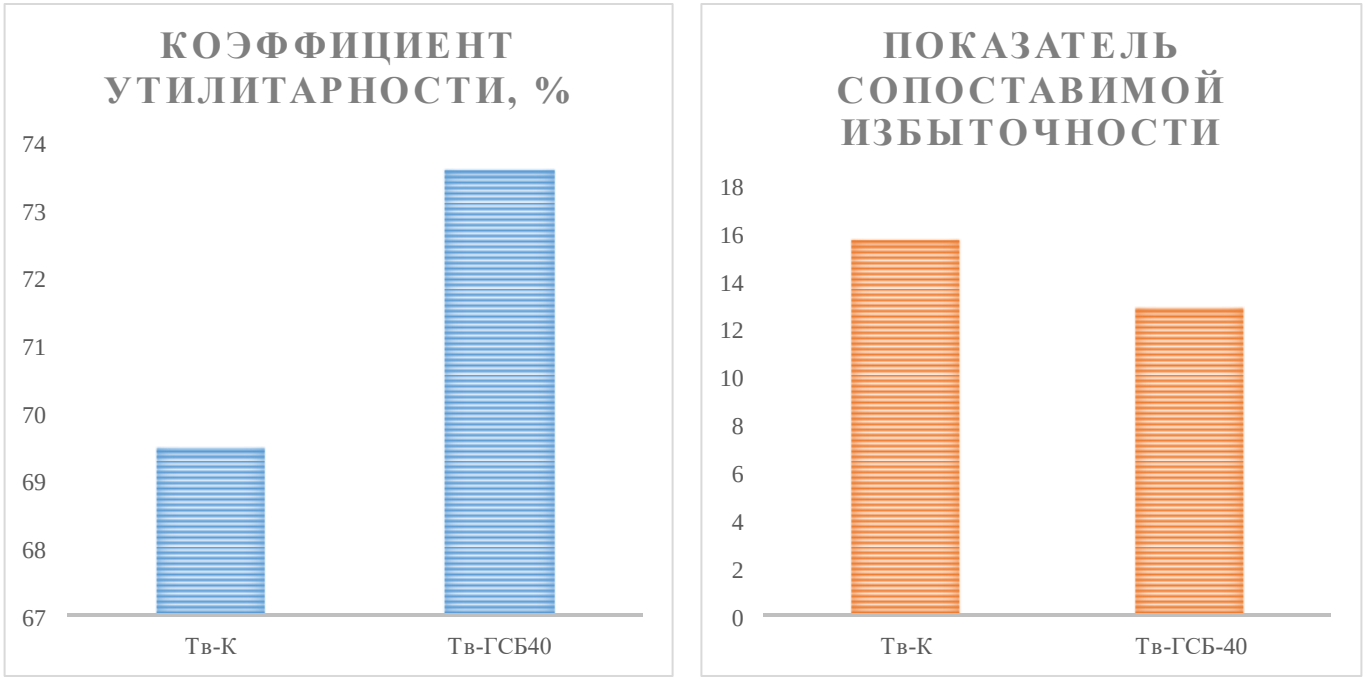


Рисунок 3.24 – Коэффициент утилитарности и показатель сопоставимой избыточности аминокислот полученных экспериментальных образцов

Оценка рекомендованных сроков годности разработанного творожного продукта

С целью установления рекомендованных сроков годности разработанного продукта был составлен график контроля показателей его качества и безопасности (таблица 3.23.)

Таблица 3.23 – График контроля основных показателей для установления рекомендованных сроков годности

Контролируемые показатели	Периодичность контроля, сутки					
	0 (фон)	3	5	7	10	15
Органолептические показатели						
Массовая доля жира, %						
Массовая доля белка, %						
Титруемая кислотность, °Т						
Степень синерезиса, %						
БГКП в 0,01 г						
БГКП в 0,1 г						
БГКП в 1 г						
Дрожжи в 1 г						
Плесени в 1 г						

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 (табл. 3.23) пробы отбирались на исследования. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 3.24.

Таблица 3.24 – 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	н/о	-	н/о	-	н/о	н/о
БГКП в 0,1 г	н/о	-	н/о	-	н/о	н/о
БГКП в 1 г	н/о	-	н/о	-	н/о	н/о
Дрожжи в 1 г	н/о	-	н/о	-	н/о	н/о
Плесени в 1 г	н/о	-	н/о	-	н/о	н/о

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.

К концу срока хранения по сравнению с началом эксперимента, массовая доля жира и массовая доля белка также остались без изменений. Небольшие отклонения значений находятся в пределах погрешности методики измерений.

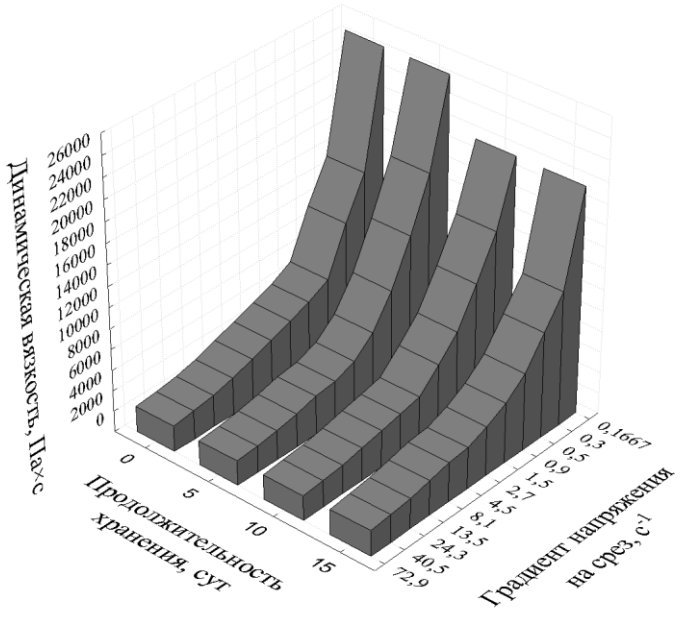
Отмечено плавное увеличение титруемой кислотности. Относительно нулевого значения титруемая кислотность увеличилась на 5 °Т без резких скачков и к концу срока хранения оставалась постоянной.

Оценка степени синерезиса показала, что 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.

Также в хранении были исследованы структурно-механические характеристики экспериментального образца творожного продукта. Данные представлены на рисунках 3.25, 3.26.

Анализ кривых течения показал (рисунок 3.25.), 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%.



0 сутки (фон): $6683{,}4x^{-0{,}596}$; $R^2 = 0{,}9875$

5 сутки: $6657{,}5x^{-0{,}678}$; $R^2 = 0{,}9931$

10 сутки: $y = 5894{,}2x^{-0{,}645}$; $R^2 = 0{,}9948$

15 сутки: $5533{,}3x^{-0{,}583}$; $R^2 = 0{,}9909$

Рисунок 3.25. – Структурно-механические характеристики образца Тв-ГСБ40 в процессе хранения

Наиболее высокие тиксотропные свойства в процессе хранения (рисунок 3.26) были установлены в «фоновый» день хранения творожного продукта. Происходило незначительное снижение показателей тиксотропности при увеличении продолжительности хранения. Спустя 10 суток хранения значение тиксотропности снизилось на 30% по отношению к нулевому дню, что является незначительным отклонением. При этом на 15 сутки хранения отмечено увеличение показателя тиксотропности. Но, анализируя кривые течения образца в данный период хранения можно отметить, что показатели вязкости имели более низкие показатели относительно нулевого дня, что и характеризует повышенные тиксотропные свойства.

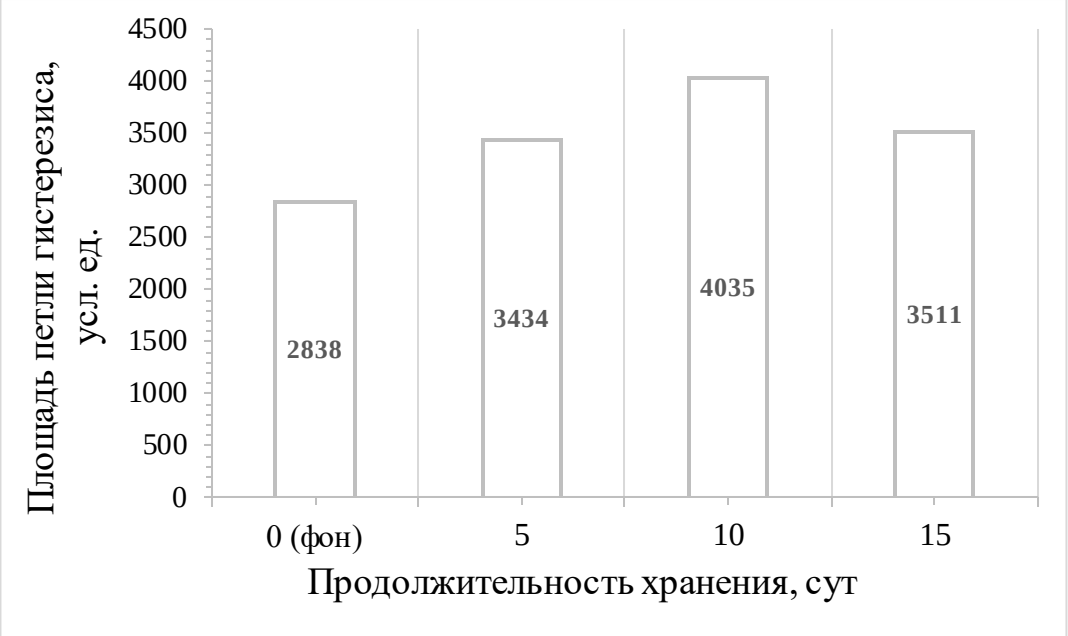


Рисунок 3.26 – Тиксотропные свойства образца Тв-КСБ50 в процессе хранения

Таким образом, 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 на аэрированный творожный продукт с «аддитивным белком» творожной сыворотки, полученным за счет ее биокаталитической конверсии ферментным препаратом продуцента *Aspergillus oryzae.*

Продукт назван «Мусс творожный».

Разработанные технические условия распространяются на на мусс творожный, вырабатываемый путем смешивания 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.

В технических условиях использованы основные понятия Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» и термины, определения к которым установлены в ГОСТ Р 52738.

Продукт вырабатывается с массовой долей жира 12,5%.

В документе регламентируются основные показатели безопасности и качества, основанные на требованиях Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), Техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» ТР ТС 033/2013 и результатах, полученных при выполнении исследований.

По органолептическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, приведенным в таблице 3.25.

Таблица 3.25 – Требования к органолептическим показателям продукта

Наименование характеристики	Содержание характеристики
Внешний вид, консистенция	Плотная, однородная, слегка мажущая консистенция. Поверхность глянцевая. Без отстоя сыворотки
Вкус и запах	Насыщенный кисломолочный, сливочно-сладковатый, без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Белый или с кремовым оттенком, равномерный по всей массе

По физико- химическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, приведенным в таблице 3.26, по микробиологическим показателям – в таблице 3.27

Таблица 3.26 – Требования к физико-химическим показателям продукта

Наименование показателя	Значение показателя
Массовая доля жира, %	12,5 ± 0,30
Массовая доля белка, %, не менее	10,0
Массовая доля влаги, %, не более	65,0
Титруемая кислотность, °Т, не более	110
Температура продукта при выпуске с предприятия, °С	4 ± 2

Таблица 3.27 – Требования к микробиологическим показателям продукта

Наименование показателя		Значение показателя
Масса продукта (г, $см^3$), в которой не допускаются:	БГКП (колиформы)	0,1
	Патогенные, в том числе сальмонеллы	25
	S.aureus	1,0
Дрожжи, КОЕ/$см^3$ (г), не более		в сумме 50
Плесени, КОЕ/$см^3$ (г), не более		

Разработанный документ содержит требования к содержанию потенциально-опасных веществ в продукте; требования к сырью для его производства; требования к маркировке и упаковке; методы контроля; требования к транспортированию и хранению. В соответствии с полученными результатами исследований, в ТУ срок хранения продукта ограничен 11 сутками при температуре хранения (4 ± 2) °С. В приложении к разработанному документу приведен пример маркировки потребительской упаковки.

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 суток при температуре (4±2) °С. Разработаны технические условия ТУ 10.51.56-060-00419785-219 «Мусс творожный»

Список использованной литературы

1. Агаркова Е. Ю. Особенности пенообразования гидролизованных молочных систем [Текст] / Е. Ю. Агаркова, К. А. Березкина, А. Г. Кручинин // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела: мат. V Межд. науч.-практ. конф. (21 – 23 октября 2015 г.). Ставрополь: Изд-во СКФУ. – 2015. – С. 7 – 9.

2. Агаркова Е. Ю. Проектирование протеолиза молочных белков для создания функциональных продуктов со сниженной аллергенностью [Текст]/ Е. Ю. Агаркова, К.А. Березкина, А. Г. Кручинин, И. В. Николаев // Пищевые инновации и биотехнологии: мат. междунар. науч.-практ. конф. / под общ. ред. А. Ю. Просекова; ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности». – Кемерово. – 2014. - Т. 1. - С. 21 – 23.

3. Агаркова Е. Ю. Разработка технологии функциональных эмульсионных аэрированных продуктов на основе трансформации полипептидных комплексов [Текст]/дисс… канд. техн. наук: 05.18.04 / Е. Ю. Агаркова. – Москва: ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии. – 2014. – 160 с.

4. Агаркова Е. Ю. Разработки ВНИМИ: технологии молочных продуктов на основе баромембранных методов [Текст]/ Е. Ю. Агаркова, Г. В. Фриденберг // Молочная промышленность. – 2011. - № 7. – С. 28 – 29.

5. Агаркова Е. Ю., Разработка аэрированного творожного продукта, обогащенного АПФ-ингибирующими пептидами [Текст]/ Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, Н. С. Пряничникова, Т. В. Федорова // Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции: мат. Междунар. науч.-практ. конф., г. Волгоград, 6-7 июня 2018 г. / Под общ. ред. акад. РАН И. Ф. Горлова. – Волгоград: Издательство Волгоградского института управления – филиала РАНХиГС. – 2018. – С. 231 – 235.

6. Аксенова Л.М. Направленная конверсия белковых модулей пищевых продуктов животного и растительного происхождения [Текст] / Л. М. Аксенова, Л. В. Римарева // Вестн. РАН. – 2017. – Т. 87. - № 4. – С. 355-357.

7. Антипова Т. А. Новое поколение гипоаллергенных продуктов детского питания [Текст]/ Т. А. Антипова, С. В. Фелик , В. В. Кузнецов, С. Е. Димитриева, Е. Ю. Агаркова, С. Г. Ботина // Молочная промышленность. – 2013. - № 12. – С. 56 – 57.

8. Антонов, В.К. Химия протеолиза [Текст]/ В.К. Антонов–М.: Наука. – 1983.- 367 с.

9. Банникова А. В. Молочные продукты, обогащенные сывороточными белками: технологические аспекты создания [Текст]/ А. В. Банникова, И. А. Евдокимов // Молочная промышленность. – 2015. - № 1. – С. 64 – 66.

10. Березкина К. А. Исследование процесса ферментативного катализа белков молочного сырья для создания функциональных молочных продуктов [Текст] / К. А. Березкина, Е. Ю. Агаркова, О. В. Королева, И. В. Николаев // Перспективные биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов: мат. VII междунар. науч.-практ. симп. / под ред. В. А. Полякова, Л. В. Римаревой; ГНУ «Всероссиский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии РАСХН. – Москва. – 2014. – С. 153 – 158.

11. Варивода А. А. Комплексная переработка молочной сыворотки мембранными методами [Текст] / А. А. Варивода, Г. П. Овчарова // Сб. науч. трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормпроизводства. – 2013. – Т. 3. - № 6. – С. 61 – 64.

12. Волкова Т. А. Функциональные продукты на основе молочной сыворотки [Текст]/ Т. А. Волкова //Переработка молока. – 2019. - № 12. – С. 50 – 51.

13. Володин Д. Н. Особенности переработки творожной сыворотки [Текст]/ Д. Н. Володин, М. С. Золотарева и др. // Переработка молока. – 2017. - № 3. – С. 6 – 8.

14. Володин Д. Н. Использование сывороточных ингредиентов в производстве продуктов питания [Текст]/ Д. Н. Володин, М. С. Золотарева, А. В. Костюк, В. К. Топалов и др. // Молочная промышленность. – 2017. - № 2. – С. 65 – 67.

15. Володин Д. Н. Переработка молочной сыворотки: понятия, стратегия, реальные технологии, адекватные инвестиции, востребованные продукты [Текст]/ Д. Н. Володин, М. С. Золотарева, В. К. Топалов, И. А. Евдокимов, А. Г. Храмцов, П. Мертин // Молочная промышленность. – 2015. - № 5. – С. 111 – 116.

16. Гаврилов Г. Б. Пути рационального использования сыворотки [Текст]/ Г. Б. Гаврилов, Э. В Кравченко // Молочная промышленность. – 2012. - № 7. – С. 47 – 49.

17. Гаврилов Г. Б. Мембранные процессы для переработки молока и сыворотки [Текст] / Г. Б. Гаврилов, Э. Ф. Кравченко , Б. Г. Гаврилов // Сыроделие и маслоделие. – 2013. - № 6. – С. 22 – 23.

18. Гаврилов Г. Б. Биомембранные процессы [Текст] / Г. Б. Гаврилов, Э. Ф. Кравченко , В. Г. Гаврилов // Молочная промышленность. – 2012. - № 7. – С. 49 – 51.

19. Гаврилов Г. Б. Справочник по переработке молочной сыворотки. Технологические процессы и аппараты, мембранное оборудование[Текст] / Г. Б. Гаврилов, А. Ю. Просеков, Э. Ф. Кравченко , Б. Г. Гаврилов – СПб: ИД Профессия. – 2015. – 176 с., табл., цв. ил.

20. Гаврилов Г.Б. Исследование и разработка технологий функциональных компонентов и пищевых продуктов на основе переработки молочной сыворотки мембранными методами [Текст]: /дис. … д-ра техн. наук. / Г. Б. Гаврилов. – Ярославль – Кемерово. – 2007.

21. Гаврилова Н. Б. Производство молочных продуктов по мембранным технологиям [Текст] / Н. Б. Гаврилова // Молочная промышленность. – 2008. - № 11. – С. 47–48.

22. Гаврилова Н. Б. Технология продукта для спортивного питания [Текст] / Н. Б. Гаврилова, Е. И. Петрова // Молочная промышленность. – 2013. - № 9. – С. 82 – 83.;

23. Гетманец В. Н. Переработка молочной сыворотки в альбумин молочный [Текст] / В. Н. Гетманец // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. - № 4 (102). – С. 78-79.

24. Головач Т. Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения [Текст] / Т. Н. Головач, В. П. Курченко // Труды БГУ. – 2010 . - Т. 5. – С. 9-55.

25. ГОСТ 26809.1-2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты.

26. ГОСТ 31457-2012 Мороженое молочное, сливочное и пломбир. Технические условия.

27. ГОСТ 32892-2014 Молоко и молочная продукция. Метод измерения активной кислотности.

28. ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа.

29. ГОСТ 34454-2018 Продукция молочная. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля.

30. ГОСТ 5867-90 Молоко и молочные продукты. Методы определения жира.

31. ГОСТ ISO 10399-2015 Органолептический анализ. Методология. Испытание «дуо-трио».

32. ГОСТ ISO 11036-2017 Органолептический анализ. Методология. Характеристики структуры.

33. ГОСТ ISO 13299-2015 Органолептический анализ. Методология. Общее руководство по составлению органолептического профиля.

34. ГОСТ ISO 4121-16 Органолептический анализ. Руководящие указания по применению шкал количественных характеристик.

35. ГОСТ ISO 6658-16 Органолептический анализ. Методология. Общее руководство.

36. ГОСТ Р 52349-2005 «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения».

37. ГОСТ Р 54667-2011 Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров.

38. ГОСТ Р 54668-2011 Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли влаги и сухого вещества.

39. ГОСТ Р 54669-2011 Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности.

40. ГОСТ Р 55246-2012 Молоко и молочные продукты. Определение содержания небелкового азота с применением метода Кьельдаля.

41. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов [Текст] / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. М.: Элевар. – 2000. – 512 с..

42. Диксон М. Ферменты [Текст] / М. Диксон, Э. Уэбб. М.: Мир. – 1982. – Т. 1–3. – 195 с., - Т. 2. - 209 с., - Т. 3. - 172 с.

43. Донской Н. С. Применение ферментативного гидролиза лактозы [Текст] / Н. С. Донской, А. Д. Лодыгин, А. Г. Варданян, Е. Ю. Пашина, А. Г. Храмцов // Молочная промышленность. – 2008. - № 11. – С. 74 – 75.

44. Дробот В. И., Мисечко Н. А., Бондаренко Ю. В., Тесля О. Д. Технологические аспекты использования лактулозы в производстве хлебобулочных изделий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/4363/1/byvtailvphi.pdf, свободный (Дата обращения 07.08.2018 г.).

45. Евдокимов И. А. Научно-технические основы интенсивной технологии молочного сахара [Текст]/дисс… докт. техн. наук: 05.18.04 / И. А. Евдокимов. – Москва: Всероссийский НИИ мясной промышленности, 1998. – 204 с.

46. Евдокимов И. А. Сухая сыворотка. Современное состояние и перспективы переработки молочной сыворотки [Текст] / И. А. Евдокимов // Переработка молока. – 2011. - № 9.

47. Евдокимов И. А. Некоторые особенности производства сухой молочной сыворотки [Текст] / И. А. Евдокимов, А. С. Бессонов, Д. Н. Володин, А. П. Поверин, В. К. Топалов // Переработка молока. – 2009. - № 7. – С. 42 – 43.

48. Евдокимов И. А. Обработка молочного сырья мембранными методами [Текст] / И. А. Евдокимов, Д. Н. Володин, М. В. Головкина, М. С. Золотарева, В. К. Топалов, С. В. Анисимов, А. А. Везирян, В. М. Клепкер, Г. С. Анисимов // Молочная промышленность. – 2012. - № 2. – С. 34 – 37.

49. Евдокимов И. А. Мембранные технологии в молочном производстве [Текст] / И. А. Евдокимов, Д. Н. Володин, В. С. Сомов, Б. В. Чаблин, В. А. Михнева, М. С. Золотарева // Молочная промышленность. – 2013. - № 9. – С. 15 – 16.

50. Евдокимов И. А. Деминерализованный пермеат как альтернатива молочному сахару [Текст] / И. А. Евдокимов, Д. Н. Володин, В. К. Топалов, В. А. Михнева // Молочная промышленность. – 2013. - № 2. – С. 38.

51. Евдокимов И. А. Рациональные технологии переработки кислой молочной сыворотки [Текст] / И. А. Евдокимов, М. С. Золотарева, Д. Н. Володин, А. С. Бессонов, А. П. Поверин, Л. Нейедлы // Молочная промышленность. - 2007.- № 11. – С. 45 – 46.

52. Евдокимов И. А. Анализ переработки молочной сыворотки и создание перспективных ресурсосберегающих технологий [Текст] / И. А. Евдокимов, М. С. Золотарева, Д. Н. Володин, В. С. Сомов // Наука. Инновации. Технологии. - 2013. - № 1. – С. 37 – 44.

53. Евдокимов И.А. Гибридные мембранные технологии молочной сыворотки [Текст] / И. А. Евдокимов, Д. Н. Володин // материалы Международной научно-практической конференции «Обеспечение качества

и хранимоспособности продуктов сыроделия и маслоделия в современных условиях». – Углич: ВНИИМС. – 2011.

54. Жидков В. Е. Научно-технические основы биотехнологии альтернативных вариантов напитков из молочной сыворотки [Текст] / В. Е. Жидков // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2000. - № 5-6. – С. 32 – 35.

55. Жижин Н. А. Использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для исследования пептидного состава молока и продуктов его переработки [Текст] / Н. А. Жижин, Е. А. Юрова // Пища. Экология. Качество. Труды XIII международной научно-практической конференции. отв. за вып.: О.К. Мотовилов, Н.И. Пыжикова и др., Краснорск, 18-19 марта 2016 г. – С. 399 – 404.

56. Залашко М. В. Биотехнология переработки молочной сыворотки [Текст] / М. В. Залашко. – М.: Агропромиздат. – 1990. – 192 с.

57. Золотарева М. С. Электродиализ – наиболее эффективный процесс деминерализации молочной сыворотки [Текст] / М. С. Золотарева, Д. Н. Володин, А. С. Бессонов, В. К Топалов // Молочная промышленность. – 2014. - № 3. – С. 37.

58. Золотарева М. С. Технология молочного сахара и его аналогов с применением мембранных и ионообменных процессов [Текст] / Золотарева М. С., Д. Н. Володин, И. А. Евдокимов, И. К. Куликова, Б. В. Чаблин // Молочная промышленность. – 2016. - № 11. – С. 56 – 57.

59. Золотарева М. С. Переработка молочной сыворотки с получением ценных пищевых ингредиентов [Текст] / Золотарева М. С., Д. Н. Володин, И. А., С. Н. Князев, Е. Н. Терешина, Б. В. Чаблин // Переработка молока. – 2015. - № 5. – С. 28 – 29.

60. Золотарева М. С. Тенденции переработки молочной сыворотки [Текст] / Золотарева М. С., Д. Н. Володин, Топалов В. К., И. А. Евдокимов, Б. В. Чаблин // Переработка молока. – 2015. - № 8. – С. 23 – 24.

61. Золотарева М. С. Вопросы переработки кислой молочной сыворотки [Текст] / Золотарева М. С., В. К. Топалов, Д. Н. Володин, И. А. Евдокимов // Сыроделие и маслоделие. – 2014. - № 6. – С. 46.

62. Инструкция по эксплуатации к вискозиметру «Реотест – 2».

63. Коржов Р. П. Клинико-физиологическая оценка эффективности кефирного биопродукта [Текст] / Р. П. Коржов, Е. И. Мельникова, Е. В. Богданова // Молочная промышленность. – 2015. - № 11. – С. 37 – 38.

64. Королева О. В. Функциональные свойства кисломолочных продуктов с гидролизатами сывороточных белков [Текст] / О. В. Королева, Е. Ю. Агаркова, С. Г. Ботина, И. В. Николаев, Н. В. Пономарева, Е. И. Мельникова, В. Д. Харитонов, А. Ю. Просеков, А. Г. Кручинин, М. В. Крохмаль, К. А. Березкина, И. В. Рожкова, Т. А. Раскошная, Е. А. Юрова, Н. А. Жижин // Молочная промышленость. – 2013. - № 11. – С. 52 – 55.

65. Королёва О. В. Перспективы использования гидролизатов сывороточных белков в технологии кисломолочных продуктов [Текст] / О. В. Королева, Е. Ю. Агаркова, С. Г. Ботина, И. В. Николаев, Н. В. Пономарева, Е. И. Мельникова, В. Д. Харитонов, А. Ю. Просеков, М. В. Крохмаль, И. В. Рожкова // Молочная промышленность. – 2013. - № 7. – С. 66 – 68.

66. Коротецкая Н. С. Современное состояние и перспективные направления переработки молочной сыворотки [Текст] / Н. С. Коротецкая // Московский государственный университет пищевых производств. – 2012.

67. Круглик В. И. Теоретическое обоснование и практическая реализация технологий гидролизатов молочных белков и специализированных продуктов с их использованием [Текст]/дис… докт. техн. наук: 05.18.04 / В. И. Круглик. – Кемерово: Всероссийский НИИ детского питания. – 2008. – 344 с.

68. Круглик В. И. Теория и практика реализации технологий специализированных продуктов на основе ферментативных гидролизатов молочных белков : монография [Текст] / В. И. Круглик / ОАО

"Нутринвестхолдинг" .— Кемерово; М.: Российские ун-ты. – 2007.— 220 с.: табл.

69. Крусь Г. Н. Технология молока имолочных продуктов [Текст] / Г. Н. Крусь, А. Г Храмцов, З. В. Волокитина, С. В. Карпычев. – М.: КолосС. – 2006. – 455 с.: ил.

70. Кручинин А. Г. Разработка технологии совместной коагуляции молочных и растительных белков в производстве творожного продукта с пониженной аллергенностью [Текст]/дисс… канд. техн. наук: 05.18.04 / А. Г. Кручинин. – Москва: ФГБНУ ВНИМИ – 2014. – 149 с.

71. Кручинин А. Г. Творожный продукт для питания людей с проявлением аллергии на молочные белки [Текст] / А. Г. Кручинин, Е. Ю. Агаркова, К. А. Рязанцева, О. В. Королева, Т. В. Федорова, В. Д. Харитонов, С. В. Карпычев, И. В. Малахов // Техника и технология пищевых производств. – 2014. - № 4. – С. 126 – 132.

72. Липатов Н. Н. Мембранные методы разделения молока и молочных продуктов [Текст] / Н. Н. Липатов, В А. Марьин, Е. А. Фетисов. – М.: Пищевая промышленность. – 1976. – 168 с.

73. Лодыгин А. Д. Пищевые продукты и концентраты, обогащенные незаменимыми нутриентами и пребиотиками, на основе глубокой переработки вторичного молочного сырья [Текст] / А. Д. Лодыгин // мат. V межд. Балтийского морского форума (21 – 27 мая 2017 г.). Калининград: ОБП «БГАРФ» ФГБОУ ВПО «КГТУ». – 2017. – С. 1369 – 1373.

74. Лодыгин А. Д. Разработка инновационных технологий пребиотических концентратов на основе вторичного молочного сырья [Текст] / дис…докт. техн. наук: 05.18.04 / А. Д. Лодыгин. – Ставрополь: Северо-Кавказский государственный технический университет. – 2012. – 333 с.

75. Лодыгин А. Д. Концентрат галактосахаридов из лактозы и ультрафильтрата молочной сыворотки [Текст] / А. Д. Лодыгин, А. Б. Родная // Молочная промышленность. – 2008. - № 12. – С. 54.

76. Лодыгин А. Д. Направленный синтез галактоолигосахаридов [Текст] / А. Д. Лодыгин, А. Б. Родная, Н. А. Перевышена // Молочная промышленность. – 2010. - № 1. – С. 51 – 52.;

77. Лодыгин А. Д. Бифидогенные концентраты на основе деминерализованной сыворотки [Текст] / А. Д. Лодыгин, А. Г. Храмцов, В. А. Барсуков, И. А. Евдокимов, С. А. Рябцева, Д. Н. Лодыгин, Д. Н. Володин, Р. И. Робиков // Молочная промышленность. – 2007. - № 4. – С. 56.

78. Мельникова Е. И. Получение функциональных производных лактозы [Текст] / Е. И. Мельникова, С. И. Нифталиев, М. О. Ширунов, Е. М. Горбунова, Е. А. Ковырялова // Международный журнал экспериментального образования. – 2010. - № 7. – С. 121.

79. Мельникова Е. И. Фукозосодержащая добавка из подсырной сыворотки [Текст] / Е. И. Мельникова, А. Н. Пономарев, О. А. Мурадова, Е. С. Рудниченко, Н. И. Новомлинская // Пищевая промышленность. – 2012. - № 7. – С. 26 – 27.

80. Минерализат молочной сыворотки – новый инновационный продукт [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://milk-industry.ru/molochnaya-syvorotka/3422-mineralizat-molochnoy-syvorotki-novyy-innovacionnyy-produkt.html, свободный (Дата обращения 05.09.2018 г.).

81. МУК 4.2.1847-04 Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов.

82. Мулдер М. Введение в мембранную технологию [Текст] / М. Мулдер; пер. с англ. А.Ю. Алентьева и Г.П. Ямпольской. – М.: Мир. – 1999. – 513 с..

83. Об основах государственной политики в области здорового питания населения Российской Федерации на период до 2020 года: распоряжение № 1873-р от 25.10.2010 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://docs.cntd.ru/document/902242308, свободный (Дата обращения 10.09.2018 г.).

84. Об утверждении отраслевой программы «Внедрение технологий, основанных на применении возобновляемых видов сырья в

агропромышленном комплексе России на 2014 - 2020 годы»: приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации № 459 от 09.10.2013 // Экологический консалтинг. 2013. № 4 (52). – С. 40 – 57.

85. ОФС.1.2.3.0022.15 Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования.

86. Патент РФ № 2081604, МПК С23С21/00, С13К5/00. Способ производства сиропа гидролизованной лактозы из творожной или казеиновой сыворотки [Текст] / Ю. А. Свириденко, В. Ю. Смурыгин, Ю. А. Боровкова, Д. В. Абрамов, В. Ф. Панова, Н. В. Яхнев – Приор. 10.07.94. – Опубл. 20.06.97.

87. Патент РФ № 2155232, МКИ С13К5/00, А23С21/00. Способ получения сиропа галактоолигосахаридов [Текст] / Г. В. Авдалян, Н. Я. Дыкало, И. А. Евдокимов, А. Г. Храмцов, С. А. Рябцева. – Приор. 11.05.99. – Опубл. 27.08.2000. – Бюл. № 27.

88. Патент РФ № 2290823, МКИ А23С23/00. Продукт энтерального питания «НУТРИЭН ДИАБЕТ» [Текст] / Т. С. Попова, В. А. Тутельян, В. И. Круглик, Г. Ю. Сажинов, А. Е. Шестопалов, И. В. Гмошинский – Приор. 28.01.2004. – Опубл. 10.01.2007. – Бюл. № 1.

89. Патент РФ № 2290823, МКИ А23С23/00. Продукт энтерального питания «НУТРИЭН ПУЛЬМО» [Текст] / Т. С. Попова, В. А. Тутельян, В. И. Круглик, Г. Ю. Сажинов, А. Е. Шестопалов, И. В. Гмошинский – Приор. 28.01.2004. – Опубл. 10.01.2007. – Бюл. № 1.

90. Патент РФ № 2311038, МКИ А23С23/00. Продукт энтерального питания «НУТРИЭН НЕФРО» [Текст] / Г. Ю. Сажинов, Т. С. Попова, В. А. Тутельян, В. И. Круглик, А. Е. Шестопалов, И. В. Гмошинский – Приор. 13.05.2005. – Опубл. 27.11.2007. – Бюл. № 33.

91. Патент РФ № 2311038, МКИ А23С23/00. Продукт энтерального питания «НУТРИЭН ГЕПА» [Текст] / Г. Ю. Сажинов, Т. С. Попова, В. А. Тутельян, В. И. Круглик, А. Е. Шестопалов, И. В. Гмошинский – Приор. 13.05.2005. – Опубл. 20.10.2007. – Бюл. № 29.

92. Патент РФ № 2311039, МКИ A23C23/00. Продукт энтерального питания «НУТРИЭН ФТИЗИО» [Текст] / Т. С. Попова, Перельман М. И., В. А. Тутельян, В. И. Круглик, Г. Ю. Сажинов, А. Е. Шестопалов, И. В. Гмошинский, Д. В. Пономарев, Л. А. Вовк – Приор. 13.05.2005. – Опубл. 27.11.2007. – Бюл. № 33.

93. Патент РФ № 2316220, МКИ A23C21/00. Продукт энтерального питания «НУТРИЭН ЭМЕНТАЛЬ» [Текст] / В. И. Круглик, Т. С. Попова, В. А. Тутельян, А. Е. Шестопалов, Л. А. Вовк, Д. В. Пономарев, И. В. Гмошинский, Н. Е. Никитина, А. А. Абрамова, Н. В. Ревякина – Приор. 27.06.2006. – Опубл. 10.02.2008. – Бюл. № 4.

94. Патент РФ № 2517617, МКИ A23C21/00. Молочно-белковый продукт [Текст] / Е. И. Петрова, Н. Б. Гаврилова. – Приор. 09.10.2012. – Опубл. 27.05.2014. – Бюл. № 15.

95. Патент РФ № 2531164, МПК A23J3/08, A23J1/20. Способ получения низкогидролизованной пептидной композиции из белков молочной сыворотки [Текст] / О. В. Королева, И. В. Николаев, Т. В. Федорова, Е. Ю. Агаркова, С. Г. Ботина, К. А. Березкина, А. Г. Кручинин, В. Д. Харитонов, Н. В. Пономарева, Е. И. Мельникова. – Приор. 11.06.2013. – Опубл. 20.10.2014. – Бюл. № 29.

96. Патент РФ № 2616275, МПК C12N 9/24, C12N 15/60, C12N 15/65, C12N 15/80. Новый рекомбинантный штамм мицелиального гриба Penicillium canescens PEP3 и получение на его основе комплексного ферментного препарата протеаз эндо- и экзодействия [Текст] / Е. А. Беневоленская, М. С. Беневоленский, С. С. Зацепин, И. Н. Зоров, А. М. Рожкова, А. П. Синицын, А. С. Середа, Е. В. Бушина. – Приор. 18.12.2015. – Опубл. 13.04.2017. – Бюл. № 11.

97. Петрова Е. И. Исследования ферментативного гидролиза белков молочной сыворотки и разработка биоактивного компонента для спортивного питания [Текст] / Е. И. Петрова, Н. Б. Гаврилова // Аграрный вестник Урала. – 2013. - № 8. – С. 33 – 35.

98. Поляков В.А. Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов [Текст]/ В. А. Поляков, Л. В. Римарева: Сборник научных трудов / под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. М.: ВНИИПБТ. – 2012. – 432 с.

99. Поляков В.А. Теоретические и практические аспекты развития спиртовой, ликероводочной, ферментной, дрожжевой и уксусной отраслей промышленности спиртовой, ликероводочной, ферментной, дрожжевой и уксусной отраслей промышленности [Текст]/ В. А. Поляков, Л. В. Римарева: сборник научных трудов. М.: ВНИИПБТ. – 2011. – 298 с.

100. Полянский К. К. Предварительная кристаллизация лактозы при сушке сыворотки [Текст] / К. К. Полянский // Переработка молока. – 2017. - № 8. – С. 24.

101. Пономарев А. Н. Применение молочной сыворотки в функциональном питании: монография [Текст] / А. Н. Пономарев, Е. И. Мельникова. – Воронеж. – 2013. – 180 с.

102. Продукты на основе казеиновой пыли и молочного жира [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://milk-industry.ru/molochnaya-syvorotka/3406-produkty-na-osnove-kazeinovoy-pyli-i-molochnogo-zhira.html, свободный (Дата обращения 04.09.2018 г.).

103. Просеков А. Ю. Особенности получения биологически активных пептидов из белков молочной сыворотки [Текст] / А. Ю. Просеков // Переработка молока. – 2010. - № 5. – С. 12 – 13.

104. Просеков А. Ю. Теория и практика формирования молочных пенообразных систем: Монография [Текст] / А. Ю. Просеков, Т. Л. Остроумова. – Москва. – 2005. – 216 с.

105. Просеков А. Ю. Получение ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с использованием протеолитических ферментов [Текст] / А. Ю. Просеков, Е. В. Ульрих, С. Ю. Носкова, В. Г. Будрик, С. Г. Ботина, Е. Ю. Агаркова, Е. И. Мельникова // Фундаментальные исследования. – 2013.- № 6. – С. 1089 – 1093.

106. Рабинович М. Л. Ангиогенин: враг или друг? [Текст] / М. Л. Рабинович, Г. С. Комолова, И. И. Ионова, Ю. Л. Рустамян // Наука и жизнь. 2000. № 7 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.nkj.ru/archive/articles/7736/, свободный. (Дата обращения 11.08.2018.).

107. Рациональность и некоторые экономические аспекты переработки сыворотки [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.milkbranch.ru/publ/view/346.html, свободный (Дата обращения 05.09.2018 г.).

108. Римарева Л. В. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности [Текст] / Л. В. Римарева, Е. М. Серба и др. // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86. - № 5. – С. 62-74.

109. Римарева Л.В. Сравнительная характеристика микробных протеаз по степени гидролиза белковых субстратов [Текст] / Л. В. Римарева, М. Б. Овчаренко, Е. М. Серба, В. В. Трифонова // Приклад. биохим. – 1997. – Т. 33. - № 1. С. 43-48.

110. Римарева Л.В. Ферменты протеолитического действия и их биокаталитические особенности при конверсии зернового сырья [Текст] / Л. В. Римарева, М. Б. Овчаренко, Е. Н. Соколова, Е. М. Серба, Н. И. Игнатова, М. Э. Медриш и др. // Вестн. Рос. сельскохозяйственной науки. – 2016. - № 6. – С. 62-64.

111. Рогов, И.А., Химия пищи. Белки: структура, функции, роль в питании: учебник для студентов ВУЗов [Текст]/ И. А. Рогов, Л. В. Антипова, Н. И. Дунченко, Н.А. Жеребцов.– М.: Колос. – 2000.–382 с.

112. Рябцева С. А. Технология лактулозы: настоящее и будущее [Текст] / С. А. Рябцева // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 1998. - № 4. – С. 45 – 47.

113. Рябцева С. А. Сыворотка молочная: получение производных компонентов [Текст] / С. А. Рябцева, А. Г. Храмцов, И. А. Евдокимов, А. Д.

Лодыгин, П. Г. Нестеренко // Молочная промышленность. - 2013. - № 6. – С. 34 – 36.

114. Сепарирование молочной сыворотки // Переработка молока. – 2010.- № 12. – С. 14 – 16.

115. Серба Е.М. Зависимость степени деструкции белковых веществ микробной биомассы от состава протеолитического комплекса [Текст] / Е. М. Серба, М.Б. Оверченко, Н.С. Погоржельская, Е.И. Курбатова, В.А. Поляков, Л. В Римарева // Вестн. Рос. сельскохозяйственной науки. – 2015. - № 2. – С. 48-51.

116. Симоненко С. В. Галактоолигосахариды: технология, анализ рынкаи коммерческие перспективы [Текст] / С. В. Симоненко, Н. А. Шахайло // Молочная промышленность. – 2015. - № 7. – С. 12 – 14.

117. Синельников Б. М. Лактоза и ее производные [Текст] / Б. М. Синельников, А. Г. Храмцов, И. А. Евдокимов и др. – СПб.: Профессия. – 2007. – 768 с.

118. Синельников Б. М. Концепция биотехнологии молочных продуктов нового поколения и возможности ее реализации / Б. М. Синельников, А. Г. Храмцов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.milkbranch.ru/publ/view/838.html, свободный (Дата обращения 07.09.2018 г.).

119. Системы извлечения компонентов из молочной сыворотки [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://milk-industry.ru/molochnaya-syvorotka/3391-sistemy-izvlecheniya-komponentov-iz-molochnoy-syvorotki.html, свободный (Дата обращения 02.09.2018 г.).

120. Смирнова И. А. Получение высокоактивного рекомбинантного штамма – продуцента грибных протеаз [Текст] / И. А. Смирнова, А. С. Середа, Т. Н. Веселкина, Л. И. Нефедова, Е. В. Костылева, Н. В. Цурикова, А. М. Рожкова, А. П. Синицын // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов: мат. VII Межд. науч.-практ. симпоз. Под ред. В. А. Полякова, Л. В.

Римаревой (9 апреля 2014 г.). Москва: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии РАСХН. – 2014. – С. – 7- 12.

121. Смирнова И. А. Новый ферментный препарат с высокой активностью пенициллопепсина на основе штамма-продуцента Pénicillium canescens [Текст] / И. А. Смирнова, А. С. Середа, Е. В. Костылева, Н. В. Цурикова, Е. В. Бушина, А. М. Рожкова, А. П. Синицын // прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. - № 6 – С. 584-591.

122. Смирнова И. А. Получение ферментного препарата грибных протеаз на основе рекомбинантного штамма Penicillum canescens [Текст] / И. А. Смирнова, А. С. Середа, Е. В. Костылева, Н. В. Цурикова, А. М. Рожкова, А. П. Синицын // Биотехнология: состояние и перспективы развития: мат. VIII Московского Международного Конгресса (17–20 марта 2015 г.). Москва: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева. – 2015. – С. – 330 – 332.

123. Суюнчев О. А. Использование молочного жира, казеиновой пыли и сывороточных белков молочной сыворотки в технологии сыра и творога [Текст] / О. А. Суюнчев // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2006. - № 3(7). – С. 75 – 78.

124. ТУ 9222-114-00419006–2013 «Продукты кисломолочные для диетического профилактического питания детей старше трех лет» [Текст]. − Истра, 2013.

125. Тутельян В. А. Реализация концепции государственной политики здорового питания населения России: научное обеспечение / В.А. Тутельян, В.А. Княжев // Вопросы питания. – 2000. - №3. – С. 4-7.

126. Федорова Т. А. Направленный ферментативный гидролиз сывороточных белков коровьего молока: идентификация биологически активных пептидов и верификация биофункциональных свойств гидролизатов in vitro [Текст] / Т. А. Федорова, М. Ю. Центалович, А. А. Торкова, Е. Ю. Агаркова, К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин // Acta Naturae:

мат. Межд. науч. конф. по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российского симп. «Белки и петиды» (Москва, ИБХ РАН, 18 – 22 сентября 2017.). – М: Издательство «Перо». – 2017. – С. 31.

127. Харитонов В. Д. Принцип рациональности применения мембранных процессов [Текст] / В. Д. Харитонов, С. Е. Дмитриева, Г. В. Фриденберг, Г. А. Донская, А. Н. Петров, Т. Е. Блинова, Е. Ю. Агаркова, П. Н. Сперанский // Молочная промышленность. – 2009. - №12. – С. 51 – 52.

128. Харитонов В. Д. Исследование основных факторов, влияющих на формирование качественных показателей новых молочных продуктов сложного сырьевого состава [Текст]/ В. Д. Харитонов, В. В. Павло, В. Н. Писменская // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2001. - №9. – С. 7-10.

129. Храмцов А. Г. Адаптация доктрины наномембранных технологий на основе кластеров молочной сыворотки [Текст] / А. Г. Храмцов // Молочная промышленность. – 2010. - № 1. – С. 34 – 37.

130. Храмцов А. Г. Белковые продукты из молочной сыворотки [Текст] / А. Г. Храмцов // Переработка молока. – 2011. - № 1. – С. 18 – 21.

131. Храмцов А. Г. Биотехнологические основы получения и применения природных БАВ на основе универсального сельскохозяйственного сырья животного происхождения – молочной сыворотки [Текст] / А. Г. Храмцов // Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ (Нарочанские чтения -11): мат. Межд. науч.-практ. конф. (20–23 сентября 2017 г.). Минск – Ставрополь: Белорусский государственный университет, Северо-Кавказский федеральный университет. – 2017. – С. – 163 – 166.

132. Храмцов А. Г. Гармонизация кластеров молочной сыворотки в технологии продуктов функционального питания [Текст] / А. Г. Храмцов // Молочная промышленность. – 2015. - № 6. – С. 36 – 38.

133. Храмцов А. Г. Инновационные приоритеты модернизации индустрии питания в парадигме нового (шестого) технологического уклада на примере

молочной отрасли АПК [Текст] / А. Г. Храмцов // Индустрия питания. – 2017. - № 1. – С. 4 – 11.

134. Храмцов А. Г. Инновационные приоритеты промышленной переработки универсального сельхозсырья – молочной сыворотки – на принципах пищевой биотехнологии [Текст] / А. Г. Храмцов // Инновации в пищевой биотехнологии: сб. трудов Межд. Симпозиума / под общ. ред. А. Ю. Просекова; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет». – Кемерово. – 2018. – С. 93 – 96.

135. Храмцов А. Г. Лактоомика – наука о молоке: модернизация наших представлений [Текст] / А. Г. Храмцов // Молочная промышленность. – 2011. - № 6. – С. 46 – 48.

136. Храмцов А. Г. Логистика формирования технологической платформы получения биокластеров жира и белков из молочной сыворотки [Текст] / А. Г. Храмцов // Техника и технология пищевых производств. – 2014. - № 2. – С. 102 – 107.

137. Храмцов А. Г. Наука о молоке – лактоомика: монография [Текст] / А. Г. Храмцов. – Ставрополь: Сервисшкола. – 2016. – 83 с.

138. Храмцов А. Г. Переработка и использование молочной сыворотки: Технологическая тетрадь [Текст] / А. Г. Храмцов. – М.: Росагропромиздат. – 1989. – 271 с.: ил.

139. Храмцов А. Г. Роль нанокластеров лактозы в биоценозе живых систем [Текст] / А. Г. Храмцов // Вестние Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2011. - № 2 (27). – С. 137 – 140.

140. Храмцов А. Г. Современные нано-, био-, мембранные и баромембранные технологии творога и мягких сыров. Миф и реальность [Текст] / А. Г. Храмцов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.dairynews.ru/news/sovremennyje_nano-_bio-membrannyje_i_biomembranny.html, свободный (Дата обращения 28.07.2018 г.).

141. Храмцов А. Г. Феномен молочной сыворотки [Текст] / А. Г. Храмцов. – СПб.: Профессия. – 2011. – 804 с., табл., ил.

142. Храмцов А. Г. Сокровище найдено: что с ним делать? [Текст] / А. Г. Храмцов, И. А. Евдокимов, П. Г. Нестеренко и др. // Молочная промышленность. – 2013. - № 6. – С. 30- 32.

143. Храмцов А. Г., Евдокимов И. А., Нестеренко П. Г. Инновационные приоритеты использования молочной сыворотки на принципах логистики безотходной технологии [Текст] / А. Г. Храмцов, И. А. Евдокимов, П. Г. Нестеренко // Молочная промышленность. – 2008. - № 11. – С. 28 – 31.

144. Храмцов А. Г. Изомеризация лактозы в лактулозу в молочной сыворотке [Текст] / А. Г. Храмцов, И. А. Евдокимов, С. А. Рябцева, А. Д Лодыгин., Л. Н. Журба // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 1998. - № 1. – С. 34 – 36.

145. Храмцов А. Г. Галактосахариды: состояние и перспективы производства [Текст] / А. Г. Храмцов, И. А. Евдокимов, С. А. Рябцева, А. Д. Лодыгин, А. Б. Родная // Молочная промышленность. – 2008. - № 12. – С. 53 – 54.

146. Храмцов А. Г. Технологическая платформа отечественного пребиотика лактулозы [Текст] / А. Г. Храмцов, И. А. Евдокимов, С. А. Рябцева, Б. М. Синельников, Ю. И. Филатов, В. Д. Харитонов, Л. Г. Андреенко, Т. А. Антипова, Н. Г. Кроха, И. И. Бурачевский, В. А. Поляков, В. В. Ким, Н. А. Киселёв // Молочная промышленность. – 2009. - № 12. – С. 53 – 56.

147. Храмцов А. Г. Инновационные технологии пребиотических концентратов на основе нанокластеров вторичного молочного сырья [Текст] А. Г. Храмцов, А. Д. Лодыгин, И. А. Евдокимов, С. А. Рябцева // Техника и технология пищевых производств. – 2012. - № 3. – С. 1 – 7.

148. Храмцов А. Г. Теоретические и практические аспекты получения пребиотеческих концентратов с регулируемым аминокислотным составом [Текст] / А. Г. Храмцов, А. Д. Лодыгин, П. Г. Нестеренко // Вестник АПК Ставрополья. – 2016. - № 4 (24). – С. 38 – 42.

149. Храмцов А. Г. Современные технологии синтеза галактоолигосахаридов из лактозы молочного сырья для продуктов

функционального питания нового поколения [Текст] / А. Г. Храмцов, А. Д. Лодыгин, А. Б. Родная // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2008. - № 3 (16). – С. 63 – 67.

150. Храмцов А. Г. Альтернативные варианты промышленной переработки молочной сыворотки [Текст] / А. Г. Храмцов, П. Г. Нестеренко, И. А. Евдокимов, С. А. Рябцева, А. Д. Лодыгин // Молочная промышленность. – 2014. - № 11. – С. 44 – 48.;

151. Храмцов, А. Г. Биотехнология напитков из молочной сыворотки: Учеб. пособие [Текст] / А. Г Храмцов, В. Е Жидков, Г. И. Холодов // Ставрополь: СтГТУ. – 1996. – 143 с.

152. Цурикова Н. В. Методы селекции мицелиальных грибов рода Aspergillus [Текст] / Н. В. Цурикова, Э. И. Бурцева, Т. Н. Веселкина, Е. В. Костылева, А. С. Середа, И. В. Смирнова, А. П. Синицын // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов: мат. VI Межд. науч.-практ. симпоз. (25–26 апреля 2012 г.). Москва: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии РАСХН. – 2012. – С. 8-20.

153. Чеботарев Е.А. Сепарирование молока и молочного сырья: История, теория, практика [Текст]/ Е. А. Чеботарев. – Ставрополь: Изд-во СКФУ. – 2012. – 299 с.

154. Червецов В. В. Процессы и методы переработки молочной сыворотки [Текст] / В. В. Червецов, Т. А. Яковлева, И. А. Евдокимов // Переработка молока. – 2007. - № 12. -С. 30- 32.

155. Шипулин В.И. Теоретические и практические аспекты биотехнологии мясопродуктов с использованием микропартикулированного сывороточного белка [Текст] / В. И. Шипулин, О. Н. Назарова // Современная наука и инновации. – 2013. - № 1. С. 55–62.

156. Adler-Nissen, J. Proteases [Text] / J. Adler-Nissen // Enzymes in food processing / edited by T. Nagodawithana, G. Reed. San Diego: Academic Press. - 1993. – P. 159 – 203.

157. Beach-Larsen T. Functional food in Europe: consumer research, market experiencies and regulatory aspects [Text] / T. Beach-Larsen, J. Scholderer // Trends Food Sci. Technol. – 2007. – Vol. 18. – P.231-234.

158. BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.brenda-enzymes.org/index.php, свободный (Дата обращения 05.09.2019 г.).

159. Charu Gupta. Whey Proteins: A Novel Source of Bioceutical [Text] / Charu Gupta, Dhan Prakash, P. Amar, Garg, Shen Gupta // Middle-East Journal of Scientific Research. – 2012. – Vol. 12(3). – p. 365 – 375.

160. Charu Gupta. Therapeutic Potential of Milk Whey [Text] / Charu Gupta, Dhan Prakash // Beverages 2017, 3(3), 31 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.mdpi.com/2306-5710/3/3/31/html#app1-beverages-03-00031. (Дата обращения: 22.04.2018.)

161. Clemente, A. Vegetable protein hydrolysates [Text] / A. Clemente, J. Vioque, F. Miiian // Nutricion y Obesidad. – 1999. – Vol. 2. – P. 289 – 296.

162. Coralie Sowa. Strategic technology combinations for the production of high purity lactose from whey permeate [Text] / C. Sowa, F. Rousset, F. Schab // European Dairy Magazine. – 2011. – Vol. 5(23 Jg.).

163. Del Mar Yust, M. Hydrolysis of chickpea proteins with Flavourzyme immobilized on glyoxyl-agarose gels improves functional properties [Text] / M. Del Mar Yust, M. Del Carmen Millán-Linares, J. M. Alcaide-Hidalgo, F. Millán & J. Pedroche // Food Science and Technology International. – 2013. – Vol. 19(3). – P. 217–223.

164. Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. World Wide Web version prepared by G.P. Moss. School of Biological and

Chemical Sciences, Queen Mary University of London [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://web.archive.org/web/20110806102349/http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html, свободный (Дата обращения 28.08.2019 г.).

165. European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. // Br J Nutr. – 1999 – V.81 – №1 – P.S1-S27.

166. Fox, P.F. Chemical and enzymatic modification of food proteins [Text]/ P. F. Fox, P. A. Morrisey, D. M. Muivihill // Developments in Food Proteins –1 (Hudson, B.J., ed.), Appl. Sci. Pub. Inc, New Jersey. – 1982. – P.1 – 60.

167. Gorlov I. F. New Approach for Lactose Transglycosylation into Galactooligosaccharides [Text] / I. F. Gorlov et al.// Pakistan Journal of Nutrition. – 2015. – Vol. 14. – No. 11. – P. 822–827.

168. Hrcova M. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates [Text] / M. Hrcova, M. Rusnakova, J. Zemanovic // Czech J. Food Sci. – 2002. – Vol. 20. – P. 7 – 14.

169. International Patent WO 2005/003329 A1, C12N 1/20. Novel galactooligosaccharide composition and the preparation thereof [Text] / Wynne et al. Great Britain. Prior 30.06.04, pat. 13.01.05.

170. Janitha, P. K. Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma [Text] / P. K. Janitha, P. D. Wanasundara , R.S. Andrew, A.Ryszard, J.A. Steve, B. P. Ronald et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002. – Vol. 50. – p. 6981–6988.

171. Jeewanthi R. K. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry [Text] / R. K. Jeewanthi, N. K. Lee, H. D. Paik // Korean J Food Sci Anim Resour. – 2015. – Vol. 35(3). – P. 350-359.

172. Jihan M. Kassem. Future Challenges of Whey Proteins [Text] / M. Jihan Kassem // International Journal of Dairy Science. – 2015. - № 10 (4). – p. 139-159.

173. Jorgensen A. L. W. Colostrum and bioactive colostral peptides differentially modulate the innate immune response of intestinal epithelial cells [Text] / A. L. W. Jorgensen, H. R. Juul-Madsen, J. Stagsted // J. Pept. Sci. – 2010. – Vol. 16. – P. 21-30.

174. Kahl, J. Functional food and organic food are competing rather than supporting concepts in Europe [Text]/ J. Kahl, A. Zalecka, A. Ploeger, S. Bugel, M. Huber // Agriculture. – 2012. – Vol. 2. – P. 316-324.

175. Kang C. Gene cloning and enzymatic characterization of an endoprotease Endo- Pro-Aspergillus niger [Text] / C. Kang, X. Yu, Y. Xu // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2013. – Vol. 40. – P. 855-864.

176. Keri Marshall. Therapeutic Applications of Whey Protein [Text] / K. Marshall // Alternative Medicine Review. – 2004. – Vol. 9. - № 2. – p. 136 – 156.

177. Komolova G. S. Milk angiogenin (Review) [Text] / G. S. Komolova, T. V. Fedorova // Applied biochemistry and microbiology. – 2002. – Vol. 38. - № 3. – P. 199 – 204.

178. Korhonen, H. Bioactive peptides: production and functionality [Text] / H. Korhonen, A. Pihlanto // Int. Dairy J. – 2006. – Vol. 16. – P. 945-960.

179. Kramtsov A. G. Paradigm of postgenomic conception on milk science lactomics formation [Text] / A. G. Kramtsov, S. A. Ryabtseva, P. G. Nesterenko // Foods and Raw Materials. – 2018. – Vol. 6. – №. 1. – p. 14 – 22.

180. Lahl W.J. Spices and seasonings: hydrolyzed proteins [Text] / W. J. Lahl, D. A. Grindstaff // Proceedings of the 6th SIFST Symposium on Food Ingredients – Applications, Status and Safety, Singapore, 27 – 29 April 1989, Singapore institute of Food Science and Technology. – 1989. – P. 51 – 65.

181. Madadlou A. Ultrasound-assisted generation of ACE-inhibitory peptides from casein hydrolyzed with nanoencapsulated protease [Text] / A. Madadlou, D. Sheehan, Z. Emam-Djomeh, M. E. Mousavi // J Sci Food Agric. – 2011. Vol. 91. – p. 2112–2116.

182. Maruyama, S. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of C-terminal hexapeptide of a-casein [Text]/ S. Maruyama, H. Mitachi, H. Tanaka, N. Tomizuka, H. Suzuki // Agric. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 51. – P. 2557-2561.

183. Meisel, H. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties [Text] / H. Meisel, W. Bockelmann // Antonie van Leeuwenhoek. – 1999. - Vol. 76. - P. 207-215.

184. Merz, M. Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes [Text] / M. Merz, T. Eisele, P. Berends, D. Appel, S. Rabe, I. Blank, T. Stressler, L. Fischer // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2015. - № 63(23). – p. 5682–5693.

185. Mizuno S. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an Aspergillus oryzae protease [Text] / S. Mizuno, S. Nishimura, K. Matsuura, T. Gotou, N. Yamamoto // J Dairy Sci. – 2004. – Vol. 87. – p. 3183–3188.

186. Niki, E. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects [Text] / E. Niki, Y. Toshida, Y. Saito, N. Noguchi // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – Vol. 338. - P. 668-676.

187. Nomenclature Committee of the International Union of Biocemistry and Molecular Biology. Enzyme Nomenclature 1992 // Recommendation of the Nomenclature Committee of the International Union of Biocemistry and Molecular Biology on Nomenclature and classification of enzymes. San Diego: Academic Press. – 1992. – 372 p.

188. Pais Chanfrau J. M.Milk Whey- From a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products for Health and Industry: An Overview from Biotechnology [Text] / J. M. Pais Chanfrau, J. Núñez Pérez and etc. // Research Article, La Prensa Medica Argentina. – 2017. – Vol: 103 Issue: 4.

189. Peña-Ramos E. A. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system [Text] /E. A. Peña-Ramos, Y. L. Xiong // J Dairy Sci. – 2001. – Vol.84. – p. 2577–2583.

190. Rao M. B. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases [Text] / M. B Rao., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, V. V. Deshpande // Microbiol and Molecular Biology Reviews. – 1998. – Vol. 62. - №3. – p. 597–635.

191. Re, R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [Text] / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 26. – P. 1231-1237.

192. Rullier B. β-lactoglobulin aggregates in foam films: Effect of the concentration and size of the protein aggregates [Text] / B. Rullier, M. A. V. Axelos, D. Langevin, B. J. Novales // Colloid Interface Sci. – 2010. – Vol. 343. – p. 330–337

193. Sarmadi B.H. Antioxidative peptides from food proteins: a review [Text] / B.H. Sarmadi, A. Ismail // Peptides. – 2010. – Vol. 31. – p. 1949-1956.

194. Spencer, J.F.T. Yeasts in Natural and Artificial Habitats [Text] / J.F.T. Spencer, D.M. Spencer. - Berlin: Springer. – 1997. – p. 381.

195. Sumantha A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective [Text] / A. Sumantha, C. Larroche, A. Pandey // Food Technol. Biotechnol. – 2006. - Vol. 44. - № 2. – p. 211–220.

196. Tage Affertsholt. Whey Book 2014 [Text] / T. Affertsholt, M. Fenger // The Global Market for Whey and Lactose Ingredients 2014–2017/3A Business Consulting. – August 2014. – 146 p.

197. Theron L.W. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry [Text] / L.W. Theron, B. Divol // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014.- № 98. – p. 8853–8868.

198. Torkova A. Cheese whey catalytic conversion for obtaining a bioactive hydrolysate with reduced antigenicity [Text] / A. Torkova, M. Tsentalovich, T. V. Fedorova, K. Ryazantzeva , E. Y. Agarkova, A. Kruchinin // Current research in nutrition and food science. – 2016. – Special Issue 2 (4). – p. 182 – 196.

199. Van der Ven, C. Biochemical and functional characterization of casein and whey protein hydrolysates. A study on correlations between biochemical and functional properties using multivariate analysis [Text] / C. Van der Ven. – 2002. – 170 pp.

200. Veloorvalappil N. J. Versatility of microbial proteases [Text] / N. J. Veloorvalappil, B. S. Robinson, P. Selvanesan, S. Sasidharan, N. U. Kizhakkepawothail, S. Sreedharan, P. Prakasan, S. J Moolakkariyil., B. Sailas //Adv. Enzyme Res. – 2013.- Vol. 1. - № 3. – p. 39–51.

201. Voynick I. M. The comparative specificity of acid proteinases [Text] / I. M. Voynick, J. S. Fruton // PNAS. – 1971. – Vol. 68. - № 2. – p. 257–259.

202. Ward O. P. Proteases, Production [Text] / O. P. Ward, M. B. Rao, A. Kulkarni // Encyclopedia of Enzymes / Ed. M. Schaechter. N. Y.: Elsevier Inc. – 2009. – p. 495–511.

203. Yoon Y. C. Characteristics of whey protein (WPC-30) hydrolysates from cheese whey [Text] / Y. C. Yoon, S. I. An, A. R. Jeong, S. E. Han, M. H. Kim, C. K. Lee // J. Animal Sci. Tech. – 2010. – Vol.52. – p. 435–440.

204. Zhang Z. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation [Text] / Z. Zhang, D. L. Smith // Protein Sci. – 1993. – Vol. 2. - № 1. – p. 522–531.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБТС – 2,2'-азинобис-(3-этил-бензотиазолинсульфонат)

АОЕ – антиоксидантная емкость

АПК – агропромышленный комплекс

АПФ – ангиотензинпревращающий фермент

БАВ – биологически активные вещества

БГКП – бактерии группы кишечных палочек

БИКОДО – бифидогенные кормовые добавки

БТС – биотехнологическая система

ГСБ – гидролизат сывороточных белков

ГОС – галактосахариды

ДЭФ – двумерный электрофорез

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИСБ – изолят сывороточных белков

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

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

Приложение 1

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ «ВНИМИ»)

ОКПД2 10.51.56.153
(ОКП 92 2290)

Группа Н17
(ОКС 67.100.10)

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора ФГАНУ «ВНИМИ»
_____ А. Г. Галстян
«___» _____ 2019 г.

МУСС ТВОРОЖНЫЙ

Технические условия
ТУ 10.51.56-060-00419785-2019

Дата введения в действие – .2019 г

РАЗРАБОТАНО:
Ученый секретарь, д.т.н.
_____ О.Б.Федотова

Зав лабораторией технологии молочно-белковых концентратов, пищевых добавок и производства продуктов на их основе , к.т.н.
_____ Е.Ю.Агаркова

Аспирант
_____ Н.А.Золотарёв

Москва
2019

Приложение 2

Утверждаю:
Генеральный директор
ООО «МОЛОДЕЛ»
_____ М. А. Голубков

АКТ №
выпуска опытной партии мусса творожного

12 декабря 2019 г. Коломенский р-н, д. Зарудня

От ООО «МОЛОДЕЛ»:

Главный технолог - Кураева Галина Васильевна

Руководитель ОКК – Агаркова Ирина Олеговна

От ФГАНУ «ВНИМИ»

Аспирант – Золотарёв Никита Александрович

Мы, нижеподписавшиеся, составили настоящий акт о том, что на ООО «МОЛОДЕЛ» 12 декабря 2019 г. осуществлен выпуск образцов мусса творожного. Выработка осуществлялась согласно технологии, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ»

Для выработки продукта в качестве сырья использовались:

Творог 9%-ной жирности, выработанный по ГОСТ 31453-2013

Сливки-сырье 10%-ной жирности по ГОСТ 34355-2017

Гидролизат сывороточных белков, полученный из сыворотки творожной соответствующей требования ГОСТ 34352-2017

Масло сливочное массовой долей жира 72,5% по ГОСТ 32261-2013

Стабилизационная система (крахмал кукурузный, желатин, моно- и диглицериды жирных кислот)

Выработка мусса творожного осуществлялась по следующим основным стадиям:

— подготовка сырья,

— составление смеси творога, сливок, масла сливочного, гидролизата сывороточных белков при температуре (20±2) °С

— подогрев смеси до 40 °С

— внесение в смесь стабилизационной системы;

— охлаждение до 16 °С;

— аэрирование в течение 5 минут при 16 °С при частоте вращения ротора 1200 об/мин

— розлив и упаковывание на автомате карусельном дозировочно-наполнительном АДНК 39 Д в стаканы из полистирола по ТУ 2293-001-43416550-99 массой нетто 200 г;

— доохлаждение до (4±2) °С.

По органолептическим и физико-химическим показателям опытно-промышленные образцы продукта соответствовали требованиям **ТУ 10.51.56-060-00419785-2019 Мусс творожный.**

Расфасованный продукт направлен на дальнейшие испытания.

_____ Кураева Г. В.

_____ Агаркова И. О.

_____ Золотарёв Н. А.

Приложение 3

Российская Академия Наук

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

Золотарёв Никита Александрович

Лауреат конкурса на лучшую
научно-исследовательскую работу в рамках

XI международной научно-практической конференции
молодых учёных и специалистов
отделения сельскохозяйственных наук РАН

«Пищевые системы:
теория, методология, практика»

Член Президиума РАН,
академик-секретарь Отделения
сельскохозяйственных наук РАН
д.т.н., профессор, академик РАН

Ю.Ф.Лачуга

ВНИХИ - филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
1 ноября 2017г.
Москва