

На правах рукописи

Агаркова Евгения Юрьевна

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОЙ СТРАТЕГИИ ТРАНСФОРМАЦИИ
ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ НОВЫХ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ В МОЛОЧНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

4.3.3. – Пищевые системы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

МОСКВА – 2023

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

Научный консультант: доктор технических наук
Семипятный Владислав Константинович

Официальные оппоненты: **Евдокимов Иван Алексеевич**
доктор технических наук, член-корреспондент РАН, заведующий базовой кафедрой технологии молока и молочных продуктов ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

Римарева Любовь Вячеславовна
доктор технических наук, академик РАН, главный научный сотрудник ВНИИПБТ (филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

Богданова Екатерина Викторовна
доктор технических наук, профессор кафедры технологии продуктов животного происхождения ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»

Защита состоится « 5 » сентября 2023 года в _____ часов _____ минут на заседании диссертационного совета 24.1.257.01 при ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26.

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

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат технических наук,
старший научный сотрудник

А.Н. Захаров

Общая характеристика работы

Актуальность работы.

Одной из основных задач Доктрины продовольственной безопасности, утвержденной указом Президента Российской Федерации от 21 января 2020 г. № 20, является формирование принципов здорового образа жизни, включающих в себя формирование рациона здорового питания для всех групп населения, и в этом особая роль отводится продуктам с функциональными свойствами. В настоящий момент индустрия функционального питания узкоспецифична и направлена на коррекцию активных патологий. В то же время существует задача профилактики функциональных расстройств организма и предотвращения заболеваний. Её решение базируется как на создании принципиально новых продуктов, так и разработке унифицированных функциональных ингредиентов, которые с успехом можно интегрировать в существующие матрицы пищевых систем. С учетом глобальных трендов на повышение эффективности использования побочных продуктов молочной промышленности на пищевые цели и большого внимания к экологизации производства, в качестве потенциальных функциональных пищевых ингредиентов могут быть рассмотрены компоненты молочной сыворотки белковой природы. Перспективность их использования в этом аспекте подтверждается многочисленными исследованиями антиоксидантных, антигипертензивных, иммуностимулирующих, антимикробных и других биологических свойств пептидов. Последние, находясь в структуре белка, ограниченно проявляют свои функциональные свойства. Деструкция белка в результате направленного протеолиза способствует получению препаратов с определенными свойствами, определяемыми доминирующими пептидами системы.

Несмотря на очевидную перспективу развития биокаталитических технологий, процесс протеолиза является достаточно дорогостоящим, в том числе, из-за трудозатратности. Его оптимизация возможна с использованием *in silico* симуляций, которые позволяют прогнозировать содержание биоактивных пептидов в гидролизатах определенного белкового сырья. Наличие больших баз данных, содержащих информацию о пептидах с известными биологическими функциями, делает возможным прогнозирование биологической активности получаемых гидролизатов; выбор биологического сырья, содержащего такие пептиды, и подбор ферментов для селективного расщепления белковых структур.

Ограничением использования функциональных ингредиентов является изменение их свойств в процессе приготовления продуктов и, как следствие, отсутствие доказанных биологических эффектов в составе функциональных продуктов. Поэтому исследование реализации биологической активности функциональных ингредиентов и созданных на их основе функциональных продуктов питания является актуальным направлением.

Степень разработанности темы исследования. Наибольший вклад в развитие научных основ биотрансформации белков животного происхождения с точки зрения получения биологически активных компонентов, их идентификации и применения в индустрии функционального питания внесли ряд отечественных и зарубежных ученых: Вострикова Н.Л., Королева О.В., Круглик В.И., Курченко В.П., Липатов Н.Н., Лисицын А.Б., Николаев И.В., Просеков А.Ю., Рогов И.А., Свириденко Ю.Я., Титов Е.И., Тихомирова Н.А., Федорова Т.В., Харитонов В.Д., Чернуха И.М., Hernández-Ledesma B., Kong S., Nandan A, Niki E., Nongonierma A.B., Pellegrini A. Pihlanto-Leppälä A. Rawlings N.D, Power O., Tavares T.G., Zhou D.Y. и другие.

Анализ и систематизация изложенных в их трудах фундаментальных результатов позволит разработать новую методологию идентификации и получения биоактивных пептидов с унифицированной применимостью для разработки инновационных технологий обогащенных и функциональных молочных продуктов.

Цель и задачи.

Целью работы являлась разработка стратегии трансформации белков молочной сыворотки в ингредиенты с доказанными функциональными свойствами и последующей технологической интеграцией в матрицы пищевых систем.

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

1. Осуществить теоретические исследования принципов направленной трансформации молочного сырья и обосновать совместимость пептидно-полисахаридных систем для усиления функционального потенциала продуктов питания с позиции глобальных мировых тенденций.
2. Установить закономерности изменения пептидного профиля технологически дифференцированных подсырных сывороток как сырья для получения функциональных пептидов.
3. Установить рациональный дизайн ферментной композиции для направленного гидролиза белков подсырных сывороток, полученных при производстве сыров с различным способом коагуляции.
4. Разработать алгоритм системного анализа и выбора оптимальных ферментных препаратов для виртуального высвобождения биоактивных пептидов и программный комплекс на его основе с возможностью автоматической загрузки данных из базы BIOPEP.
5. Разработать прогностическую модель процесса гидролиза белков подсырных сывороток с детализацией температурных, временных и концентрационных особенностей систем.
6. Провести идентификацию белкового профиля биологически активных пептидов, полученных биокаталитической конверсией белков подсырных сывороток, методом *in silico* анализа с использованием баз данных BIOPEP, ACEpredDB, ExPASy.

7. Охарактеризовать физико-химические и биофункциональные свойства пептидных гидролизатов на моделях *in vitro* и *in vivo*.
8. Разработать технологию базового аэрированного молочного продукта на основе пептидных гидролизатов, полученных биокаталитической конверсией белков подсырной сыворотки с внесением стабилизационной системы и оптимизировать его состав.
9. Протестировать и доказать *in vitro* и *in vivo* функциональные свойства базового аэрированного молочного продукта на основе пептидных гидролизатов с внесением стабилизационной системы
10. Разработать частные технологии группы однородных обогащенных молочных продуктов на основе пептидных гидролизатов.

Научная новизна.

Разработана комплексная стратегия исследования пептидных гидролизатов и продуктов на его основе, включающая следующие этапы: биоинформационное программирование, характеристика функциональных свойств *in vitro* с верификацией полученных экспериментальных данных *in vivo*.

Предложена иерархическая схема выбора предпочтительных гидролизатов сывороточных белков по совокупности органолептических, физико-химических и функциональных свойств.

Получены закономерности формирования функционального потенциала белков технологически дифференцированных молочных сывороток от пептидного профиля.

Разработан системный подход к ранжированию ферментных препаратов по биологической активности и сенсорному профилю образующихся пептидов, базирующийся на инкорпорировании данных по идентифицированным основным и минорным монокритериям в интегральный критерий желательности. Доказано, что созданный на его основе алгоритм прогнозирования органолептического профиля, функциональной активности и частоты встречаемости высвобождаемых пептидов возможно использовать для подбора ферментов при гидролизе любых белковых субстратов.

Разработана модель зависимости скорости ферментативного гидролиза от температуры и времени, позволяющая рассчитывать интегральным способом антиоксидантную способность по отношению к кислородному радикалу с учетом температурных вариаций на протяжении всего процесса.

Приведены зависимости величин функциональной активности гидролизатов сывороточных белков от продолжительности протеолиза и фермент-субстратного соотношения.

Получены зависимости органолептических, структурно-механических и функциональных свойств базового аэрированного продукта от дозы внесения гидролизатов.

Установлены закономерности формирования газодисперсной структуры базового аэрированного продукта от технологически-аппаратурных параметров его получения.

Теоретическая и практическая значимость.

Результаты работы представляют собой концептуальный подход по получению пищевых ингредиентов белковой природы с доказанными функциональными свойствами. Предложенные принципы позволят усовершенствовать традиционную парадигму создания функциональных ингредиентов и расширить область их применения.

Создано программное обеспечение для виртуального высвобождения пептидов, обладающих наибольшей биологической активностью с возможностью автоматической загрузки данных из базы BIOPER.

Разработанный на примере белков молочной сыворотки алгоритм является унифицированным, и может быть использован для анализа любых белков, находящихся в открытом доступе в пептидных базах.

Результаты определения биофункциональных свойств с подобранными методами и подходами могут быть использованы для тестирования любых видов молочных продуктов с функциональным потенциалом и способны минимизировать затраты и снизить риски при проведении клинических испытаний.

Полученный функциональный ингредиент – пептидный гидролизат (СТО 00419785-044-2019) может быть использован для получения широкой гаммы обогащенных продуктов. О чем свидетельствует успешное внедрение разработанных на его основе шести видов обогащенных продуктов: «Муссы творожные обогащенные» ТУ 10.51.56-060-00419785-2019, «Суфле творожное обогащенное» ТУ 10.51.56-086-00149785-2022, «Пасты творожные обогащенные» ТУ 10.51.56-088-00149785-2022, «Кисели молочные обогащенные» ТУ 10.51.56-090-00149785-2022, «Напитки молочные обогащенные» ТУ 10.51.56-091-00149785-2022, «Кремы творожные обогащенные» ТУ 10.51.56-092-00149785-2022.

Технологии разработанных обогащенных продуктов внедрены на 4-х молокоперерабатывающих предприятиях, что подтверждается актами о внедрении.

Методология и методы исследования.

При выполнении работы применялись стандартизованные и оригинальные методы, используемые при контроле и анализе физико-химических, микробиологических и органолептических характеристик молока и молочной продукции.

Для оценки и идентификации, характеристики пептидов и подбора ферментных препаратов использовались методы биоинформационного (*in silico*) и цифрового программирования.

Исследования *in vivo* проводились согласно протоколам Директивы 2010/63 / EU «Правила испытаний на животных».

Работа выполнена на базе ФГАНУ «ВНИМИ». Ряд специфичных анализов осуществлен с привлечением специалистов ФИЦ Биотехнологии РАН с разделением научных результатов Исследования по тестированию *in vitro* и *in vivo* были выполнены в рамках гранта РФФИ 16-16-00094 «Разработка технологии получения новых функциональных ингредиентов животного

происхождения – пептидных гидролизатов молочных белков и создание функциональных продуктов на основе гидролизатов, про- и пребиотиков».

Положения, выносимые на защиту.

1. Теоретические принципы и практические решения по проведению протеолиза вторичного молочного сырья в зависимости от белкового состава и способа получения для максимально возможного высвобождения биоактивных пептидов
2. Новые данные, полученные при помощи *in silico* анализа, для рационального дизайна ферментных композиций для гидролиза белков подсырных сывороток, полученных при производстве сыров с различным способом коагуляции
3. Программа системного анализа и выбора оптимальных ферментных препаратов для виртуального высвобождения биоактивных пептидов с возможностью автоматической загрузки данных из базы BIOPEP
4. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* полифункциональных свойств пептидных гидролизатов и полученного на их основе обогащенного базового аэрированного продукта.
5. Технологические решения по получению группы новых обогащенных продуктов с использованием унифицированного ингредиента – пептидного гидролизата с доказанными функциональными свойствами.

Личный вклад соискателя

Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно и является результатом многолетних научных исследований. Автором лично определены актуальность, цель и задачи, объекты и методы исследований; получены и обобщены теоретических и экспериментальных данные, сформулированы основные результаты и выводы.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов подтверждается проведением теоретических и экспериментальных исследований с использованием общепринятых подходов и современных достижений фундаментальных и прикладных наук; корректным использованием средств и методик, статистической обработкой экспериментальных данных; публикацией результатов работ в рецензируемых журналах с высоким индексом цитирования.

Основные положения и результаты работы представлены на российских и международных конференциях: г. Москва (2016, 2017 (2), 2021, 2022 (2) 2023 (2)); г. Краснодар (2016); г. Волгоград (2019); г. Углич (2019,2021); г. Красноярск (2021); г. Вологда (2021).

Работа была отмечена золотыми медалями «За разработку технологии производства обогащенных молочных продуктов здорового питания в рамках ресурсосбережения и импортозамещения» (Агропромышленная выставка «Золотая осень», г. Москва, 2017 г.); Всероссийский смотр-конкурс лучших пищевых продуктов. Москва, 2017 г.); и «За разработку молочного напитка на основе гидролизатов сывороточных белков» (Всероссийский смотр-

конкурс лучших пищевых продуктов, продовольственного сырья и инновационных разработок, Волгоград, 2019 г.).

Публикации.

По материалам диссертационной работы опубликовано 79 печатных работ, из которых 2 монографии; 1 учебник, 10 статей в журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus; 19 статей в журналах, рекомендованных ВАК; 44 публикации в журналах, индексируемых в РИНЦ, и материалах конференций.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, 7 глав, заключения и библиографии. Основное содержание изложено на 260 страницах и включает в себя 112 таблиц и 63 рисунка. Библиография включает 285 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, показана научная новизна и практическая значимость, сформулирована цель и поставлены задачи, показана практическая значимость, представлены методологические основы работы, достоверность и уровень апробации, сформулированы научные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен аналитический обзор российских и зарубежных материалов, на базе которых определены наиболее перспективные направления развития в области биокаталитических технологий в пищевой промышленности.

Показана актуальность использования белков молочной сыворотки с точки зрения получения на их основе функциональных пищевых ингредиентов, выявлены теоретические и практические пробелы в области биокаталитической конверсии сывороточных белков и прогнозирования их свойств.

Выявлено, что расчетные методы позволяют предсказывать содержание биоактивных пептидов в гидролизатах белкового сырья с известной аминокислотной последовательностью. Наличие баз данных, содержащих сотни пептидов с известными биологическими функциями, делает возможным прогнозирование новых пептидов с улучшенной биологической активностью, выбор биологического сырья, содержащего такие пептиды и подбор ферментов для селективного расщепления белкового сырья.

Дано обоснование использования протеомного анализа при разработке функциональных продуктов на основе молочных белков, показано что он является необходимым с точки зрения выявления белковых последовательностей, имеющих определенные биофункциональные свойства. Показано, что при проведении протеомного анализа с предшествующим биоинформационным исследованием возможно с уверенностью гарантировать наличие у белков тех или иных свойств, а, следовательно, и позиционировать их как функциональные ингредиенты.

На основании данных базы NCBI и согласно номенклатуре Международного союза биохимиков и молекулярных биологов (NC-IUBMB), а также анализа групповой специфичности протеаз для проведения гидролиза сывороточных белков предварительно были определены следующие ферментные препараты: химотрипсин А ЕС 3.4.21.1, трипсин ЕС 3.4.21.4, протеиназа К ЕС.3.4.21.67, химотрипсин С ЕС 3.4.21.2, папаин ЕС 3.4.22.2, термолизин ЕС 3.4.24.27, кокколизин ЕС 3.4.24.30, субтилизин ЕС 3.4.21.62, пепсин ЕС 3.4.21.4, пролилолигопептидаза ЕС 3.4.21.26, клостирипаин ЕС 3.4.22.8, олигопептидаза В, ЕС 3.4.21.83, протеиназа P1 ЕС 3.4.21.96, глицилэндопептидаза ЕС 3.4.22.25 и олигопептидаза F.

Показана актуальность разработки программных решений для оптимизации прогнозирования биофункциональных свойств и сенсорного профиля пептидов, высвобождаемых в процессе виртуальной ферментативной деструкции.

Проанализированы антиоксидантные, антигипертензивные, противомикробные, иммуномодулирующие и противодиабетические свойства белков молочной сыворотки. Теоретически определены условия для максимального высвобождения биологически активных пептидов из последовательностей сывороточных белков.

Определены методы тестирования и доказательства биофункциональных свойств гидролизатов сывороточных белков для более объективной их оценки. Доказана перспективность использования гидролизатов сывороточных белков в аэрированных молочных системах, показано, что при помощи ферментативного гидролиза возможно улучшить реакционные свойства белков с точки зрения пенообразования.

Во второй главе представлены методология, объекты и методы исследований. Схема организации проведения экспериментальных работ представлена на рисунке 1.

Объектами исследований являлись: сыворотки, полученные при производстве различных сыров; образцы пектинов, мусс творожный, выработанный по ТУ 9222-021-00419785-2016; муссы творожные экспериментальные с частичной заменой молока на концентрат сывороточных белков (КСБ) и гидролизат, ферментные препараты Alcalase® 2.4 L FG (субтилизин) (Alc), Protamex® FG (субтилизин) Novozymes A/S (Дания) (Prot), Thermolysin® FG Promega, США (Therm). При выполнении работы применялись стандартизованные методы. Определение массовой доли (м.д.) жира проводили по ГОСТ 5867-90, м.д. белка методом Кьельдаля по ГОСТ 23327-98, активной кислотности по ГОСТ 32892-2014, определение м.д. сухих веществ по ГОСТ Р 54668-2011, определение м.д. углеводов по ГОСТ Р 54667-2011, плотности по ГОСТ Р 54758-2011, органолептические показатели оценивали по ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011.



Рисунок 1 – Схема организации проведения экспериментальных работ

Исследование белкового состава подсырных сывороток проводилось с использованием белкового ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях с последующей идентификацией белковых полос методом MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрии с использованием тандемного

времени пролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme с лазерной десорбцией/ионизацией MALDI-TOF/TOF (“Bruker”, Германия). Обработку масс-спектров осуществляли с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (“Bruker Daltonics”, Германия), идентификацию белков – при помощи программы Mascot.

Подбор протеолитических ферментных композиций проводился с использованием *in silico* анализа белковых последовательностей на портале BIONEER.

Сепарирование сывороток проводили на лабораторном электросепараторе «Сатурн» (АО «Рыбинские моторы», Россия). Нарботку КСБ для последующего гидролиза осуществляли на пилотной ультрафильтрационной установке AL 362 с мембранами из полиэфирсульфона (ООО «Альтаир», Россия).

Нарботку концентратов для последующего гидролиза осуществляли на пилотной ультрафильтрационной установке AL 362 с мембранами рулонного типа из полиэфирсульфона (ООО «Альтаир», Россия).

Пептидный профиль анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией ионно-циклотронного резонанса с использованием системы, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), колонки Reprosil-Pur Basic C18 и ультра-масс-спектрометра LTQ-FT (Thermo Scientific, Waltham, MA, США). Масс-спектрометрический анализ проводили в диапазоне m/z 300-1600 и разрешением $R=50000$ для m/z 400. Для автоматического поиска по базам данных анализа пептидов использовали программное обеспечение Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., США, version 8.5). Идентификацию пептидов осуществляли при помощи программы Mascot version 2.0.04 (“Matrix Science”, Великобритания). Для идентификации белков использовалась база данных Uniprot Bostaurus. Автоматическая фильтрация и валидация списка белков и пептидов осуществлялась с использованием программы Scaffold 4.0 (version Scaffold-01_07_00, “ProteomeSoftware”, Oregon, США).

Поиск биологически активных аминокислот проводили с использованием базы данных: ANTPDB – antihypertensive peptide database; MilkAMP – milk antimicrobial peptides; Milk Bioactive Peptide Database (MBPDB, BIONEER-UWM. Степень гидролиза (СГ) и содержание свободных аминокислот (САК) определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм и 420 нм соответственно.

Антиоксидантная емкость (АОЕ) и антигипертензивная активность (АГА) *in vitro* определялась флуоресцентным методом ORAC с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (США). Определение АОЕ проводили с генерацией пероксильного радикала в реакционной среде. АГА определялась способности ингибировать АПФ с внутренним тушением флуоресценции. Бифидогенная активность *in vitro* определялась в отношении тест-штамма *Bifidobacterium adolescentis* MC 42 с термостатированием в анаэробных условиях.

Тестирование *in vivo* АОЕ и гепатопротекторных свойств проводилось на самцах крыс линии Wistar на модели индуцированного окислительного стресса путем введения животным четыреххлористого углерода. Оценка гипотензивных свойств *in vivo* проводилась с использованием крыс линии SHR с устойчиво высоким уровнем артериального давления.

Оценка *in vivo* гипохолестеримических свойств проводилось на крысах линии Wistar с ежедневным внутрижелудочным введением гидролизата или продукта на его основе. Оценка *in vivo* влияния на микробиоценоз кишечника было проведено на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза, путем ежедневного внутрижелудочного введения крысам линии Wistar антибиотика в течение 3-х дней.

Оптимизацию условий ферментативного гидролиза сывороточных белков и внутрикомпозиционного состава базового продукта проводили по методологии многофакторного эксперимента с двумя переменными параметрами.

В третьей главе представлен алгоритм проведения протеолиза молочного сырья для получения функциональных белковых компонентов, программа системного анализа и выбора оптимальных ферментных препаратов для виртуального высвобождения биоактивных пептидов с возможностью автоматической загрузки данных из базы ВЮРЕР. Биоинформационным программированием подтверждена возможность использования в качестве источника биоактивных пептидов белков молочной сыворотки.

Иерархическая схема выбора предпочтительных гидролизатов сывороточных белков представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 – Иерархическая схема выбора предпочтительных гидролизатов сывороточных белков

Согласно первому этапу (рисунок 2) был предварительно исследован качественный и количественный состав подсырных сывороток, полученных

при производстве различных групп сыров: полутвердые, мягкие молодые, твердые, мягкие плесневые и мягкие сыры без созревания.

Показано, что в состав сывороток из-под сычужных сыров (полутвердые, мягкие молодые, твердые, мягкие плесневые) входят преимущественно белки сывороточной фракции (α -лактальбумин и β -лактоглобулин). В то время как белковый профиль сыворотки из-под мягких сыров без созревания представлен на 76 % фракциями β -, α - и κ -казеина (табл. 1), сывороточные белки составляют 24 %.

Далее был исследован аминокислотный состав основных белковых фракций для выявления потенциальной биологической активности. В таблице 2 представлено суммарное количество аминокислот (АК), содержащихся в исследуемых белках и детерминирующих горький вкус потенциальных продуктов протеолиза и их антиоксидантную емкость (АОЕ), антигипертензивную и антимикробную активность (АМА).

Таблица 1 – Фракционный состав белков различных видов сывороток

Белок	Массовая доля в сыворотке, %				
	1	2	3	4	5
α -лактальбумин	20	20	19	20	12
β -лактоглобулин	50	56	56	63	12
Бычий сывороточный альбумин	8	5	6	6	~0
α -s1-казеин	-	-	-	-	26
α -s2-казеин	~0	~0	~0	~0	
β -казеин	-	-	-	-	50
κ -казеин	9	4	11	5	
Имуноглобулин G1, тяжелая цепь	8	8	5	4	~0
Лактопероксидаза	3	5	2	1,4	
Ксантинооксидаза	2	2	1	0,6	

№1 – сыворотка от полутвердых сыров, №2 – сыворотка от мягких молодых сыров, №3 – сыворотка от твердых сыров, №4 – сыворотка от мягких плесневых сыров, №5 – сыворотка от мягких сыров без созревания

В целом аминокислотные профили α -лактальбумина и β -лактоглобулина схожи с аминокислотным профилем смеси β - и κ -казеинов, существенно отличается только содержание пролина, содержание которого минимально в фракциях β - и κ -казеина (таблица 2). Высокое содержание пролина является маркером противомикробной активности пептидов. Наличие горьких аминокислот также приблизительно одинаково, также в казеиновых белках в пять раз выше по сравнению с сывороточными содержание цистеина, отвечающего за антигипертензивную и антиоксидантную активность.

Опираясь на данные по белковому составу подсырных сывороток, разработан рациональный дизайн мультиферментной композиции для их гидролиза с использованием *in silico* анализа. Установлены приоритеты – максимальный выход биологически активных пептидов, отсутствие

аллергенных эпитопов и минимизация горечи. Последнее предполагало анализ аминокислотных последовательностей на наличие дескрипторов горького вкуса.

Таблица 2 – Содержание горьких аминокислот и биологическая активность сывороточных белков

АК	Количество АК	Горький вкус	Наименование активности
Сывороточная фракция (α -лактальбумин, β -лактоглобулин)			
P	55	+	АМА
L	40	+	АОЕ, АГА
Y	13	+	АОЕ, АГА
F	16	+	АОЕ, АГА
A	25	+	–
W	2	+	АОЕ, АГА
I	24	+	–
M	11	–	АОЕ, АГА
T	26	–	АОЕ, АГА
C	3	–	АОЕ, АГА
H	9	–	АМА
R	9	–	АМА
Казеиновая фракция β -казеин, κ -казеин			
P	10	+	АМА
L	44	+	АОЕ, АГА
Y	8	+	АОЕ, АГА
F	10	+	АОЕ, АГА
A	24	+	–
W	6	+	АОЕ, АГА
I	19	+	–
M	8	–	АОЕ, АГА
T	17	–	АОЕ, АГА
C	15	–	АОЕ, АГА
H	6	–	АМА
R	4	–	АМА

Из находящихся в базе данных ВЮРЕП 34 протеолитических ферментов, основываясь на оптимумах их действия, описанных в литературных данных, для протеолиза сывороточных белков были определены химотрипсин А ЕС 3.4.21.1, трипсин ЕС 3.4.21.4, протеиназа К ЕС.3.4.21.67, химотрипсин С ЕС 3.4.21.2, папаин ЕС 3.4.22.2, термолизин ЕС 3.4.24.27, кокколизин ЕС 3.4.24.30, субтилизин ЕС 3.4.21.62, пепсин ЕС3.4.21.4, пролилוליгопептидаза ЕС 3.4.21.26, клостирипаин ЕС 3.4.22.8, олигопептидаза В, ЕС 3.4.21.83, протеиназа Р1 ЕС 3.4.21.96, глицилэндопептидаза ЕС 3.4.22.25 и олигопептидаза F.

Был проанализирован профиль потенциальной биологической активности, максимально возможная степень гидролиза, частота встречаемости биоактивных фрагментов в последовательности β -

лактоглобулина, β - и κ -казеина, доля которых в сыворотках наибольшая (сыворотка №1-4 и №5 соответственно).

На первом этапе виртуального скрининга было установлено, что для проведения протеолиза β -лактоглобулина с точки зрения получения биоактивных пептидов гипотетически подходят 8 ферментов химотрипсин А, трипсин, протеиназа К, химотрипсин С, папаин, термолизин, кокколизин и субтилизин. По остальным ферментам либо отсутствуют достоверные данные, либо количество биоактивных пептидных центров было значительно ниже, чем в вышеперечисленных.

Результаты анализа частоты встречаемости обнаруженных биоактивных и горьких пептидов (A_E) представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что при использовании всех восьми ферментов для гидролиза β -глобулина в большей части будет происходить высвобождение АПФ и - ДПП ингибирующих пептидов, наиболее часто встречающихся в термолизиновых, кокколизиновых, папаиновых и химотрипсиновых гидролизатах. Помимо частоты встречаемости большое значение имеет величина обнаруженных активностей, представленная в таблице 4. В таблицу вынесены пептиды с наиболее высокой концентрацией полумаксимального ингибирования (<1000 мМ).

Таблица 3 – Коэффициенты частоты встречаемости обнаруженных биоактивных и горьких пептидов

Наименование активности	Гидролизат химотрипсина А	Гидролизат трипсина	Гидролизат протеиназы К	Гидролизат термолизина	Гидролизат химотрипсина С	Гидролизат папаина	Гидролизат кокколизина	Гидролизат субтилизина
АПФ-ингибирование	0,0124	0,0311	0,0435	0,0435	0,0488	0,0248	0,0407	0,0186
Стимуляция всасывания глюкозы	0,0062					0,0124		0,0124
ДПП IV-ингибирование	0,0248	0,0248	0,0745	0,0311	0,0244	0,0683	0,0244	0,0248
Антиоксидантная	0,0124		0,0248	0,0124		0,0124	0,0081	0,0186
Ингибирование ренина	0,0062	-	0,0062	0,0124	-	0,0062	-	-
Регулирование активности ФГК*	0,0062	-	0,0124	-	-	-	-	-
Антибактериальная	-	0,0124	-	-	-	-	-	-
Гипохолестеримическая	-	0,0062	-	-	-	-	-	-
Иммуномодулирующая	-	-	-	-	-	-	0,0163	-
Противовоспалительная	-	-	-	-	-	-	0,0081	-
Са-связывающая								
Потенциально горькие пептиды	0,0497	0,0124	0,1429	0,1180	0,1180	0,0807	0,0807	0,0932

*- фосфолипаза

Пептиды с наиболее высокой антигипертензивной активностью были обнаружены при применении химотрипсина С (KW) ИК₅₀ 1,63 мМ (и субтилизина 7,1 и 9,2 мМ (VF и VY). Наилучшей противодиабетической активностью обладал пептид VL с концентрацией полумаксимального ингибирования 74 мМ, идентифицированный в химотрипсиновых, термолизиновых, папаиновых и субтилизиновых гидролизатах.

При прогнозировании свойств гидролизатов немаловажное значение имеют органолептические показатели. При анализе сенсорного профиля наибольшее внимание было уделено наличию в гидролизатах горьких пептидов и свободных аминокислот, частота встречаемости которых представлена в таблице 3. Наименьшее количество горьких пептидов ($A_E=0,0124$) зафиксировано в трипсиновых гидролизатах, наибольшее ($A_E=0,1429$) – в гидролизатах, полученных с протеиназой К. Помимо наличия горьких пептидов, горечь гидролизата может быть усилена присутствием большого количества лейцина, изолейцина и фенилаланина. Наибольшее количество L и F (6 из 8) по отношению к общему количеству горьких пептидов идентифицировано в гидролизате химотрипсина А, наименьшее в гидролизате химотрипсина С (8 из 45). Также в гидролизатах папаина, субтилизина и трипсина обнаружены аминокислоты аргинин и лизин, способные нивелировать горечь, а также пептид ЕЕ.

Самые высокие величины биологической активности имели пептиды в составе гидролизата химотрипсина С, самой низкой частотой встречаемости горьких пептидов отличались гидролизаты химотрипсина С, трипсина, папаина и кокколизина.

Таблица 4 – Величина потенциальной биологической активности при гидролизе β -лактоглобулина различными ферментами

Пептидная последовательность	Расположение в полипепт. цепи	АПФ-ингиб. активность, мМ	ДПП-ингиб. активность, мМ
Химотрипсин А			
SF	[149-150]	130,20	-
RVY	[40-42]	205,60	-
VL	[93-94]	-	74,00
Трипсин			
ALPMHIR	[141-147]	43,00	-
GLDIQK	[9-14]	580,00	-
FDK	[135-137]	389,00	-
ПАЕК	[70-74]	63,70	-
IPAVFK	[77-82]	144,80	143,00
TPEVDDEALEK	[124-134]		319,50
VLVLDTDYK	[91-99]		424,40
Протеиназа К			
SF	[149-150]	130,20	-
KP	[46-47]	22,00	-
TP	[48-49]	288,40	-
Термолизин			
IR	[146-147]	695,00	-
IP	[77-78]	130,00	410,00
AP	[37-38]	230,00	
FDK	[135-137]	389	
LEK	[132-134]	794,4	-
LR	[39-40]	158	-
Химотрипсин С			
KW	[59-60]	1,63	-

Пептидная последовательность	Расположение в полипепт. цепи	АПФ-ингиб. активность, мМ	ДПП-ингиб. активность, мМ
KP	[46-47]	22,0	-
RVY	[40-42]	205,6	-
TP	[48-49]	288,4	-
IL	[55-56]	54,95	-
AL	[131-132]	-	882,13
VL	[93-94]	-	74,00
Папаин			
VR	[122-123]	52,8	-
MKG	[7-9]	71,85	-
VL	[93-94]	-	74,00
AL	[85-86], [131-132] [141-142]	-	882,13
VR	[122-123]	-	826,1
Кокколизин			
IR	[146-147]	695	-
IP	[77-78]	130	410,0
AP	[37-38]	230	-
AV	[79-80]	956,28	-
FDK	[135-137]	389	-
LEK	[132-134]	794,4	-
Субтилизин			
VF	[80-81]	9,2	-
VY	[41-42]	7,1	-
VAGTW	[15-19]	534	-
VL	[93-94]	-	74,00

Но при этом в них обнаружены аллергенные эпитопы – ККПАЕ (гидролизат химотрипсина С); TPEVDDEALEK, LSFNPTQLEEQCHI (гидролизат трипсина); DAQSAP, AEKTKI (гидролизаты папаина) и LLENK, FCMENS, AEPEQS, LVRTPEVDDE (гидролизаты кокколизина). Значительная вычислительная нагрузка при сопоставлении большого числа показателей в процессе выбора оптимального ферментного препарата для протеолиза сывороточных белков привела к необходимости создания программных решений, способных учесть и систематизировать всю совокупность факторов.

Для выбора оптимального фермента было разработано программное обеспечение, рассчитывающее оценку каждого фермента, интегрирующую различные показатели работы фермента, такие как ингибирование АПФ, ингибирование дипептилпептидазы (ДПП IV), антиоксидантная активность и т. д. Дополнительно, в программе учтено количество свободных аминокислот, образующихся в процессе работы фермента, и количество пептидов, отвечающих за горький привкус продукта, как факторы, негативно влияющие на финальную оценку фермента. Расчет производился с помощью функции Харрингтона, граничные показатели которой определялись ранговым методом относительно показателей активности выбранных ферментов. Общая оценка фермента рассчитывалась по формуле 1:

$$C_j = \sqrt{\sum w_i \prod_{i=1}^n d_{ij}^{w_i}} \quad (1)$$

где C_j – интегральная оценка j -го фермента, d_{ij} – значение функции Харрингтона j -го фермента по i -му показателю, w_i – вес i -го показателя (для основных показателей $w_i = 1$, для дополнительных показателей $w_i = 0,5$).

Результаты работы программы для бета-лактоглобулина представлены на рисунке 3.

Выбор белка
 Бета-лактоглобулин Казеин

Основные показатели

- АПФ ингибитор (ACE)
- Ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP IV)
- Иммуномодулятор (IMM)
- Ингибитор ренина (RI)
- Антиоксидантная активность (AO)

Дополнительные показатели

- Свободные аминокислоты (Free AA)
- Горечь (Bitter)
- Сладкий вкус (Sweet)
- Ингибитор горечи (Bitter I)
- Усилитель вкуса (Enhancer)

Расчет

Загруженные ферментные препараты

Фермент	Аmino acid sequence
chymotrypsin (A) EC 3.4.21.1	L-IVTQTM-KGL-DIQKVAGTW-Y-SL-AM-AASDISL-L-DAQSAPL-RVY-VEL-KPTPEGDL-EIL-L-QKW-EN-GECAQKIIAEKTKIPAVF-KIDAL-N-EN-KVL-VL-DTDY-KKY-L-L-F-CM-EN-SAEPEQSL-ACQCL-VRTPEVDDEAL-EKF-DKAL-KAL-PM-H-IRL-SF-N-PTQL-EEQCH-I
trypsin EC 3.4.21.4	LIVTQTMK-GLDIQK-VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR-VYVELK-PTPEGDLLELQK-WENGECAQK-K-IIA-EK-TK-IPAVFK-IDALNENK-VLVDLTDYK-K-YLLFCMENSAPLQSLACQCLVLR-TPEVDDEALEK-FDK-ALK-A-LPMHIR-LSFNPTQLEEQCHI
Proteinase K (Endopeptidase So) EC.3.4.21.67	L-I-V-TQTM-KGL-DI-QKV-AGTW-Y-SL-AM-AASDI-SL-L-DAQSAP-L-RV-Y-V-EL-KP-TP-EGDL-EI-L-L-QKW-ENGECAQKII-AEAKTKI-P-AV-F-KI-DAL-NENKV-L-V-L-DTDY-KKY-L-L-F-CM-ENSAEP-EQSL-ACQCL-V-RTP-EV-DDEAL-EKF-DKAL-KAL-P-M-HI-RL-SF-NP-TQL-EEQCHI
thermolysin EC 3.4.24.27	L-I-VTQTMKG-LD-IQK-V-AGTW-YS-L-AM-A-ASD-IS-L-LD-AQS-AP-LR-V-Y-VE-LKPTPEGD-LE-I-L-LQKWENGEC-AQK-I-I-AEATK-IP-A-V-FK-ID-A-LNENK-V-L-V-LDLDY-YK-Y-L-L-FCMENS-AEP-EQS-L-ACQCL-L-VRTPE-VDDA-A-LEK-FDK-A-LK-A-LPMHIR-IR-LS-FNPTQ-LEEQCH-I
chymotrypsin C EC 3.4.21.2	L-IVTQ-TM-KGL-DIQ-KVAGTW-Y-SL-AM-AASDISL-L-DAQ-SAP-L-RVY-VE-L-KP-TP-E-GDL-E-IL-L-Q-KW-E-N-GE-CAQ-KKIIAE-KTKIP-AVFKIDAL-N-E-N-KVL-VL-DTDY-KKY-L-L-FCM-EN-SAE-P-E-Q-SL-ACQ-CL-VRTP-E-VDDA-AL-E-KFKAL-KAL-P-M-HIRL-SFN-P-TQ-L-E-E-Q-CHI
papain EC 3.4.22.2	L-IVT-QT-MKG-L-DI-QKV-AG-T-WYSL-AM-A-ASDISL-L-D-A-QS-APL-R-VYVEL-KPT-PEG-DL-EIL-L-QKWENG-EC-A-A-QKII-AEKT-KIP-AV-F-KID-AL-NENKVL-VL-DT-DYKYL-L-F-CMENS-AEPE-QSL-AC-QCL-VR-T-PEVDDE-AL-EKF-DK-AL-K-AL-PMHIR-L-SF-NPT-QL-EE-QCHI
coccolysin EC 3.4.24.30	L-IVTQTMKG-LD-IQKV-AGTW-YS-L-AM-A-ASD-IS-L-LD-AQS-AP-LRV-YVE-LKPTPEGD-LE-I-L-LQKWENGEC-AQK-I-I-AEATK-IP-AV-FK-ID-A-LNENKV-LV-LDLDY-YK-Y-L-L-FCMENS-AEPEQS-L-A-QCC-LVVRTPEVDDE-A-LEK-FDK-A-LK-A-LPMHIR-IR-LS-FNPTQ-LEEQCH-I
subtilisin EC 3.4.21.62	L-I-VTQTMKGL-DIQK-VAGTW-Y-S-L-AMAAS-DIS-L-L-DAQS-APL-R-VY-VEL-KPTPEGDL-EIL-L-QKW-ENGECAQKIIAEKTKIPAVF-KIDAL-NENK-VL-VL-DTDY-KKY-L-L-F-CMENS-AEPEQS-L-ACQCL-VRTPEVDDEAL-EKF-DKAL-KAL-PMHIRL-S-F-NPTQL-EEQCHI

Расчетные показатели активности

Тип расчета	ACE BE	DPP IV BE	AO AE	Bitter AE	Bitter I AE	Free AA II
chymotrypsin	0.0000779149	0.0000864024	0.0124 [*]	0.0497 [*]	0. [*]	11. [*]
trypsin	0.0003115236	0.00007751034	0. [*]	0.0124 [*]	0.0124 [*]	2. [*]
proteinase K	0.000360609	0.00001000132	0.0248 [*]	0.1429 [*]	0. [*]	22. [*]
thermolysin	0.003486916	0. [*]	0.0081 [*]	0.118 [*]	0. [*]	27. [*]
chymotrypsin C	0.000666982	0.00001234771	0. [*]	0.1118 [*]	0. [*]	30. [*]
papain	0.000186963	0.00001843284	0.0163 [*]	0.0807 [*]	0.0186 [*]	15. [*]
coccolysin	0.003486916	0. [*]	0.0081 [*]	0.0807 [*]	0. [*]	17. [*]
subtilisin	0.000134353	3.1089820387*^-6	0.0081 [*]	0.0932 [*]	0.0062 [*]	15. [*]

Граничные значения функции Харрингтона

Показатель	0.2 [*]	0.66 [*]
ACE	0.000186	0.000666
DPP IV	0.000031	0.000084
AO	0.0081	0.0124 [*]
Bitter	0.081 [*]	0.118 [*]
Bitter I	0. [*]	0.0062 [*]
Free AA	22. [*]	15. [*]

Результирующие показатели критериев

{chymotrypsin (A) EC 3.4.21.1, 0.3415392880076199^{*}} {trypsin EC 3.4.21.4, 0.0020055061329018035^{*}}

{Proteinase K (Endopeptidase So) EC.3.4.21.67, 0.1742278030874221^{*}} {thermolysin EC 3.4.24.27, 0.03302978683518737^{*}}

{chymotrypsin C EC 3.4.21.2, 0.0017404249036004921^{*}} {papain EC 3.4.22.2, 0.194434343422^{*}}

{coccolysin EC 3.4.24.30, 0.19862364735958543^{*}} {subtilisin EC 3.4.21.62, 0.2844740920550893^{*}}

Рисунок 3 – Интерфейс программы по подбору оптимального фермента

При ранжировании по интегральному показателю наилучшими значениями среди 8 ферментов обладали химотрипсин С (0,314) и субтилизин (0,284). По аналогичному принципу для каппа-казеина были выбраны термоллизин (0,434) и субтилизин (0,371).

По результатам обработки в полученной программе данных *in silico* моделирования для гидролиза сывороток №1-4 будут использоваться ферментные препараты на основе субтилизина, (из-за содержания в гидролизате химотрипсина С аллергенных эпитопов); сыворотки №5 – на основе субтилизина и термолизина.

Среди коммерчески доступных протеаз на основе субтилизина на рынке наиболее широко представлены Alc и Prot. Согласно литературным данным по специфичности и рекомендациям производителей этих протеаз использование данной комбинации позволяет без потери биологической активности уменьшить вероятность образования горьких пептидов.

В таблице 5 представлены данные производителей по физико-химическим характеристикам ферментных препаратов протеолитического действия, выбранных *in silico* и обработанных в полученной программе для гидролиза белков подсырных сывороток.

Таблица 5 – Физико-химические характеристики ферментных препаратов

Ферментный препарат	Продуцент	макс. СГ, %	Оптимум		Инактивация	
			pH	t, °C	t, °C	τ, мин
Alc	<i>Bacillus licheniformis</i>	15-25	7,0-8,0	50-60	80-85	10
Prot	линии <i>Bacillus</i>	10-20	7,0-8,0	45-50	85	10
Therm	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	30-45	8,0	60-70	85-90	30

В таблице 6 представлены результаты гидролиза концентратов различных сывороток. В качестве контролируемых параметров исследовали степень гидролиза (СГ), антиоксидантную активность по отношению к поглощению свободных кислородных радикалов (ORAC) и САК.

Таблица 6 – Оптимальные параметры процесса гидролиза и критерии оценки эффективности

№ образца сыворотки*	Оптимумы переменных параметров				Контролируемые параметры		
	τ, мин.	Фермент-субстратное соотношение (E/S), %			СГ, %	ORAC, мкМ ТЭ**/г	САК, %
		Prot	Therm	Alc			
1	94,8	3,25	-	0,75	12,88	552,39	11,92
2	90	3,00	-	1,00	14,40	417,22	10,78
3	120	3,88	-	0,12	16,48	451,13	10,32
4	90	3,00	-	1,00	6,00	424,70	9,05
5	121,2	2,00	1,00	1,00	21,55	457,90	2,94

*здесь и далее по тексту – нумерация образцов в соответствии с таблицей 1

** тролокс эквивалент

С помощью модели равновесия – модифицированного уравнения Михаэлиса-Мэнтен, учитывающего баланс между активной, неактивной и

инактивированной формами фермента, удалось осуществить прогнозирование антиоксидантной активности гидролизатов подсырных сывороток с учетом варибельности параметров процесса гидролиза, неизбежно возникающих в условиях промышленного производства.

Уравнение скорости ферментативного гидролиза в зависимости от температуры и времени процесса в равновесной модели имеет вид:

$$V(T, t) = \frac{k_{cat} E_0 e^{\frac{k_{inact} S t}{1+S}}}{1+S} \quad (2),$$

$$S = e^{k_{eq} \left(\frac{1}{T_{eq}} - \frac{1}{T} \right)}$$

$$k_{cat} = \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta G_{cat}}{RT}\right)}, k_{inact} = \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta G_{inact}}{RT}\right)}$$

где E_0 – концентрация фермента; k_{cat} – каталитическая константа фермента; k_{inact} – константа скорости тепловой инактивации; k_{eq} – константа равновесности, равная отношению изменения энтальпии системы, при переходе фермента в неактивную фазу, к универсальной газовой постоянной (R); T_{eq} – температура равенства активной и неактивной фазы; k_B – постоянная Больцмана; h – постоянная Планка; ΔG_{cat} – энергия активации каталитической реакции; ΔG_{inact} – энергия активации процесса денатурации.

Для анализируемых ферментных препаратов экспериментальным путем с последующим статистическим приближением были получены ключевые параметры равновесной модели, представленные в таблице 7.

Таблица 7 – Ключевые параметры равновесной модели протеолиза

Ферментный препарат	ΔG_{cat} , кДж/моль	ΔG_{inact} , кДж/моль	k_{eq} , кК	T_{eq} , К
Alc	78±5,3	94±5,3	21±1,9	65±4,8
Prot	62±3,9	93±6,1	47±2,2	57±4,1
Therm	75±4,7	101±6,7	18±2,1	78±5,5

Так как в производственных условиях невозможно добиться точной термостатичности процесса было разработано программное обеспечение, интегрирующее уравнение (1) во времени в зависимости от температурных колебаний.

Также программное обеспечение позволяет удобно рассчитывать скорость реакции для комбинаций ферментных препаратов с различными параметрами модели. На рисунке 4 продемонстрирован график зависимости скорости реакции от температурного режима во времени.

Для расчета прогнозируемой антиоксидантной активности по отношению к кислородному радикалу в зависимости от температурных колебаний требуется проинтегрировать функцию вдоль пути изменения температуры, на примере обозначенного синими точками (рисунок 4).

По указанным в таблице 4 оптимальным условиям были выработаны и исследованы гидролизаты белков всех пяти видов сыворотки (ГСБ 1-5).

Перед проведением гидролиза все сыворотки сепарировали с использованием лабораторного сепаратора, после чего получали концентрат белков подсырных сывороток, далее проводили концентрирование до массовой доли сухих веществ 8–11 % и содержания общего белка 3,2–3,8%.

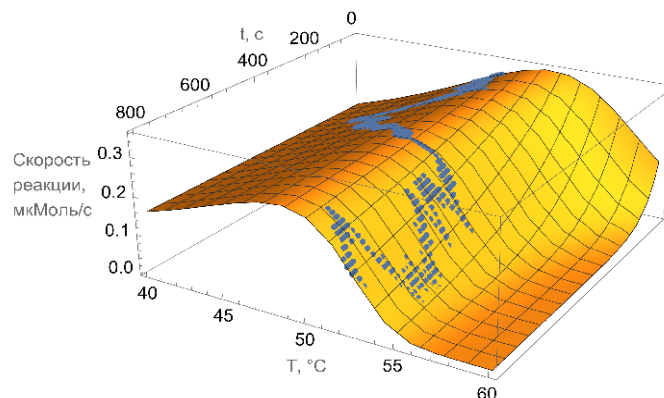


Рисунок 4 – Функция скорости реакции гидролиза от температурно-временных характеристик на примере препарата Prot по модели равновесия.

На рисунке 5 представлено молекулярно-массовое распределение образцов подсырных сывороток и их ферментативных гидролизатов. Показано, что в результате гидролиза подсырных сывороток №№1 – 4 (ГСБ 1-4) происходит значительное снижение доли высокомолекулярной фракции (>10 кДа) в сторону средне (3-10 кДа) и низкомолекулярной (<3 кДа) фракций, с преобладанием среднемолекулярной фракции (от 47% до 58%) (рисунок 5). В то время, как в гидролизате подсырной сыворотки №5 (ГСБ 5), практически отсутствует высокомолекулярная фракция (>10 кДа), при этом доля средне- и низкомолекулярной фракции составляет 40,87% и 55,08% (рисунок 5).

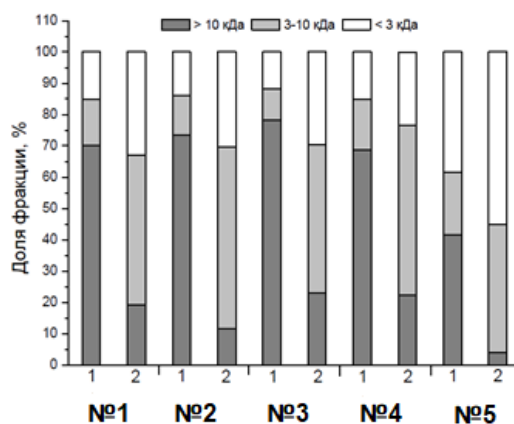


Рисунок 5 – Соотношение пептидных фракций с различным диапазоном молекулярных масс в образцах исходных подсырных сывороток (1) и их ферментативных гидролизатах (2)

В образцах, белковых гидролизатов сывороток №№1–4 идентифицировано от 83 до 102 пептидов размером от 8 до 26

аминокислотных остатков. В пептидном гидролизате подсырной сыворотки № 5 идентифицировано 85 пептидов длиной 5-14 аминокислотных остатков, при этом, средняя молекулярная масса пептидов составляла 925 ± 65 Да.

Из общего количества идентифицированных пептидов около 61% образованы при гидролизе β - и κ -казеинов, что согласуется с преобладанием фракций казеиновых белков в составе подсырной сыворотки от мягкого сыра без созревания (таблица 8).

Таблица 8 – Белки-предшественники пептидов, идентифицированных в составе белковых гидролизатов подсырных сывороток

Белок-предшественник	Количество идентифицированных пептидов, шт.				
	№1	№2	№3	№4	№5
α -лактальбумин	13	8	5	10	6
β -казеин	10	8	6	20	33
β -лактоглобулин	42	36	38	35	2
Неохарактеризованный протеин	16	19	8	8	10
κ -казеин	7	8	8	8	19
Z- α -2-гликопротеин	3	5	2	4	-
GLYCAM1*	4	5	7	5	10
Сывороточный альбумин	3	3	2	1	-
Полимерный рецептор иммуноглобулина	-	3	-	-	4
Лактоферрин	-	1	2	-	-
Лактопероксидаза	-	3	2	4	-
Гликопротеин тромбоцитов	-	1	-	-	-
Na-зависимый фосфатный белок-транспортер	-	-	1	-	-
Активирующий фактор транскрипции	-	-	1	-	-
Ксантиндегидрогеназа	-	-	1	-	-
β -2-микроглобулин	-	-	-	-	1
Нуклеобиндин-1	-	-	-	-	2
Эпификан	-	-	-	-	2

* – зависящая от гликозилирования молекула клеточной адгезии

При помощи масс-спектрометра с фрагментацией были измерены точные массы пептидов и их фрагментов, далее по результатам хромато-масс-спектрометрического анализа проб и биоинформационного анализа с использованием поисковых программ Mascot и MaxQuant были идентифицированы пептиды, находящиеся в гидролизатах.

Анализ последовательностей идентифицированных пептидов с помощью базы данных BIONEER позволил установить присутствие в составе всех гидролизатов пептиды, содержащих антиоксидантные, гипотензивные фрагменты. Стоит отметить, что все пептиды, идентифицированные в гидролизатах и содержащие фрагмент VVPP, несут на С-конце пептида

фенилаланин, что может значительно усилить АПФ-ингибирующую активность. АПФ-ингибирующий фрагмент VLDTDYK (ИК₅₀ 946 мкМ) так же является одним из наиболее часто встречающихся фрагментов. Наибольшее количество фрагментов с АПФ-ингибирующей активностью представлено в гидролизате белков сыворотки от мягкого сыра без созревания, характеризующимся так же наименьшим размером идентифицированных пептидов (5-14 АК остатков) и максимальной АПФ-ингибирующей активностью гидролизата.

Наибольшее число пептидов, содержащих остатки редокс-активных аминокислот (тирозина, триптофана, метионина, цистеина и гистидина, фенилаланина) обнаружено в гидролизате сыворотки №4, составившее около 75% от общего числа идентифицированных пептидов. Для гидролизатов сыров №№1–3 и №5 содержание пептидов, в состав которых входят редокс-активные аминокислоты составило 58%, 63%, 70% и 66% соответственно.

В составе гидролизата фракций казеина (ГСБ 5) обнаружено максимальное количество пептидов с предсказанной антимикробной активностью (наличие таких аминокислотных дескрипторов, как R, K, P, W, L). Таким образом, с использованием биоинформатического подхода получены белковые гидролизаты из подсырных сывороток, обладающие предсказанными функциональными активностями, для подтверждения их наличия будут проведены исследования *in vitro* и *in vivo*.

В четвертой главе описана характеристика ГСБ *in vitro* и *in vivo*. В качестве сигнальных активностей при тестировании гидролизатов *in vitro* выбраны антиоксидантная, антигипертензивная и антимикробная. Результаты тестирования АОЕ и АГА представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Уровень биологической активности белков КСБ и ГСБ

Образец	Антиоксидантная активность, мкМ ТЭ/ г белка	АПФ-ингибирующая активность, IC ₅₀ , мг белка/мл
КСБ 1	39,5±13,0	33,5±1,1
ГСБ 1	417,2±22,0	2,5±0,03
КСБ 2	170,8±14,0	16,2±0,5
ГСБ 2	517,8±57,2	1,5±0,03
КСБ 3	97,2±7,9	25,7±1,2
ГСБ 3	511,4±25,1	2,2±0,1
КСБ 4	124,2±11,1	22,6±1,6
ГСБ 4	424,7±14,3	1,6±0,04
КСБ 5	154,3±7,4	3,5±0,1
ГСБ 5	497,1±62,9	0,5±0,02

АОЕ гидролизатов всех типов была сравнима и составляла в среднем 400-600 мкМ ТЭ/г белка. Значительные отличия отмечены в гипотензивной активности пептидных гидролизатов. Так, ГСБ 5, имел самую высокую гипотензивную активность (ИК₅₀ 0,5 мг белка/мл), по сравнению с остальными. Полученные результаты коррелируют с количеством идентифицированных в гидролизатах антигипертензивных и антиоксидантных пептидов.

Показана антимикробная активность обеих типов гидролизатов в отношении тест-штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Наиболее выраженной антимикробной активностью обладали ГСБ 3 и 5, что коррелирует с данными *in silico* прогнозирования.

Для дальнейших исследований по совокупности анализа всех биологических активностей были определены ГСБ 3 и ГСБ 5.

На *in vivo* модели индуцированного окислительного стресса путем введения животным четыреххлористого углерода показаны антиоксидантные и гепатопротекторные свойства гидролизатов, результаты представлены в таблице 10.

Величина АОЕ и активность ЛДГ в сыворотках крови животных не имеет значимых отличий для всех исследованных групп и на 30 день эксперимента. Содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови животных всех исследованных групп также не имело значимых отличий. Тем не менее, отмечалась тенденция к снижению величины данного показателя у животных, получавших гидролизаты на фоне индукции свободнорадикальной патологии печени. В отличие от сыворотки крови по содержанию ТБК-реактивных продуктов в печени исследованные группы животных существенно различались друг с другом.

Наибольшее содержание ТБК-реактивных продуктов в печени было отмечено у животных контрольной группы с интоксикацией тетрахлоридом углерода (группа №3), которое в 1,6-1,8 раза превышало величину данного показателя у животных контрольной группы без интоксикации (группы №1 и №2).

Таблица 10 – Показатели антиоксидантного статуса лабораторных животных при тестировании антиоксидантных и гепатопротекторных свойств ГСБ *in vivo*

Показатель	Группа						
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7
АОЕ, кровь мМ ГЭ	13,3±0,5	13,1±0,6	12,9±0,5	13,6±0,7	14,8±0,6	13,8±0,4	15,6±0,8
ТБК-реакт. прод. *, кровь мкМ МДА**	1,2±0,4	1,5±0,3	3,8±0,4 ^a	3,15±0,5 ^b	2,80±0,3 ^c	3,0±0,2 ^b	2,69±0,2 ^c
ТБК-реакт. прод. печень нмоль МДА/г	28,1±3,4	30,3±5,1	52,1±3,8 ^a	41,6±3,2 ^b	38,4±2,8 ^c	40,2±3,7 ^b	36,3±2,5 ^c
АЛТ, Ед/л	46,3±4,4	60,9±8,1	67,7±8,5	63,9±7,8	65,2±5,1	58,7±4,7	57,2±5,0
АСТ, Ед/л	47,2±5,8	119,7±9,4	127,1±11,0	118,8±7,7	109,2±7,9	128,2±9,8	111,6±7,4
ЛДГ, Ед/л	602±14	597±11	581±19	610±16	616±18	589±13	600±17

* ТБК - тиобарбитуровая кислота, ** МДА - малоновый диальдегид

Группа №1- интактная, общевиварный рацион (ОР), №2 - ОР +2мл вода, 1 день 0,5 мл/кг стер. рафинированного и дезодорированного подсолнечного масла; № 3-7 - 1 день 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированном подсолнечном масле (2:5 об. /об.), №3 - ОР +2мл вода; №4 – ОР+КСБ 3; №5 – ОР+ГСБ 3; №6 – ОР+КСБ 5; №7 – ОР+ГСБ 5. Для групп 3-7 разными литерами указаны статистически отличимые средние значения показателей.

На фоне приема гидролизатов у животных отмечалось снижение содержания ТБК-реактивных продуктов в печени, при этом группы №5 и №7 (таблица 10) показали статистически значимое наиболее сильное снижение.

В таблице 11 представлены результаты определения артериального давления (АД) у лабораторных животных.

Среднее систолическое давление у крыс на момент начала эксперимента составляло 175 ± 14 мм рт. ст. (таблица 11).

Таблица 11 – Результаты определения АД у крыс SHR в начале и конце эксперимента

Группа, №	Систолическое АД, мм.рт.ст.			Диастолическое АД, мм.рт.ст.		
	В начале	В конце	ΔP	В начале	В конце	ΔP
1. Вода (Контроль)	175 ± 14	179 ± 15	+4	120 ± 7	124 ± 10	+4
2. КСБ 3	170 ± 11	150 ± 12	-20	127 ± 8	102 ± 7	-25
3. ГСБ 3	181 ± 16	154 ± 13	-27	114 ± 12	102 ± 8	-12
4. КСБ 5	179 ± 15	158 ± 13	-21	124 ± 11	109 ± 8	-15
5. ГСБ 5	172 ± 12	145 ± 11	-27	114 ± 10	100 ± 5	-15

Показано статистически значимое снижение среднего систолического давления при внутрижелудочном введении гидролизатов. Гипотензивный эффект на 30 день эксперимента для КСБ составил $\Delta P = 20$ мм. рт. ст., для соответствующих гидролизатов $\Delta P = 27$ мм. рт. ст. (таблица 11).

Для выяснения механизмов гипотензивного действия гидролизатов были измерены концентрации основных компонентов ренин-ангиотензиновой системы: ангиотензинов I и II (таблица 12) – не совсем ясно, кто 1 и 2. Концентрация ангиотензина I в крови опытных групп животных (получавших гидролизаты) была выше и составляла 3,1-4,5 пг/мл, по сравнению с контрольной группой – 1,3 пг/мл (таблица 12).

Таблица 12 – Концентрация компонентов ренин-ангиотензиновой системы в сыворотке крыс в конце эксперимента

Группа, №	Ангиотензин I, пг/мл	Ангиотензин II, пг/мл
1. Вода (Контроль)	$1,3 \pm 0,09$	$5,66 \pm 0,21$
2. КСБ 3	$3,8 \pm 0,12$	$6,25 \pm 0,30$
3. ГСБ 3	$4,5 \pm 0,18$	$2,88 \pm 0,03$
4. КСБ 5	$3,4 \pm 0,11$	$4,51 \pm 0,33$
5. ГСБ 5	$3,1 \pm 0,12$	$3,86 \pm 0,15$

Концентрация ангиотензина II в крови опытных групп животных была ниже и составляла 2,88-3,86 пг/мл, по сравнению с контрольной группой – 5,66 пг/мл (таблица 12). Полученные данные по изменению концентраций ангиотензинов I и II в сыворотке крови опытных групп коррелируют с данными по снижению давлению у животных в этих группах, поскольку имеет место обратная регуляция между содержанием ангиотензина II и ангиотензина I. Когда уровень ангиотензина II снижен вследствие

ингибирования действия АПФ, повышается уровень ангиотензина I. Таким образом, в основе механизма антигипертензивного эффекта гидролизатов *in vivo* лежит ингибирование ангиотензин АПФ, поскольку оба типа гидролизатов обладают АПФ ингибирующей активностью *in vitro*.

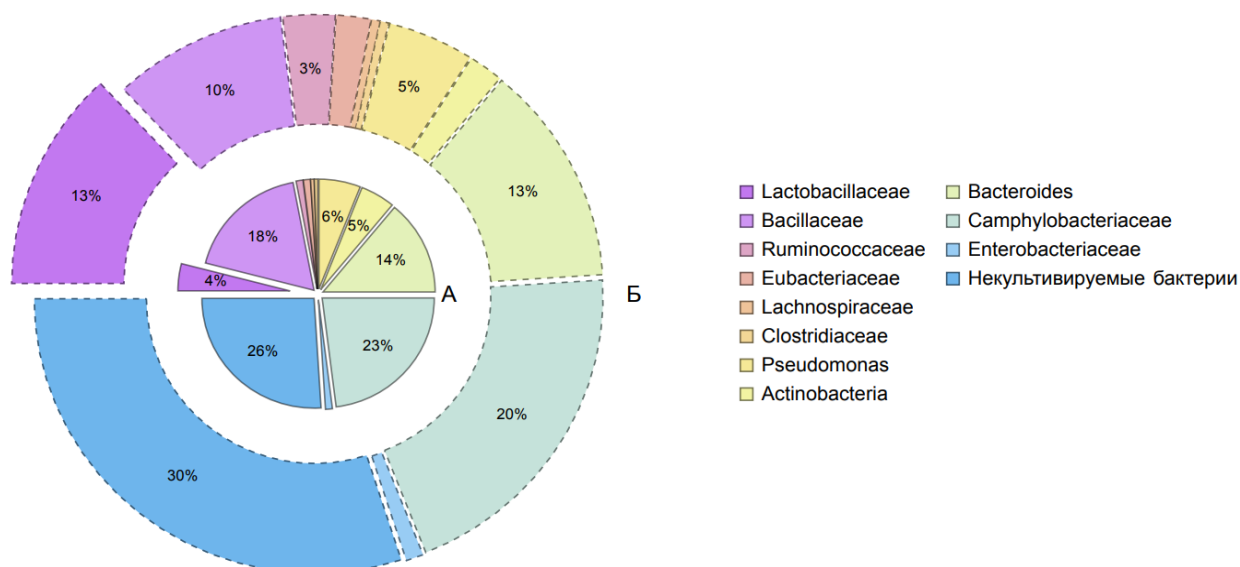


Рисунок 6 – Состав микрофлоры у животных экспериментальных групп в модели антибиотико-индуцированного дисбиоза (А – до кормления, Б – после кормления)

На модели с антибиотико-индуцированным дисбиозом исследованы пребиотические свойства пептидных гидролизатов. Показано статистически достоверное увеличение примерно в 3 раза ($p < 0,05$) относительного содержания лакто- и бифидобактерий в каловых массах экспериментальных животных, получавших на фоне приема антибиотика гидролизаты (рисунок 6).

Таким образом, на моделях *in vitro* и *in vivo* подтверждена биологическая активность полученных гидролизатов, на следующем этапе будут проведены комплексные исследования по интеграции гидролизатов в матрицу базового продукта.

В пятой главе показано влияние охарактеризованных с точки зрения биофункциональных свойств гидролизата как на структурно-механические, так и на органолептические свойства базового аэрированного продукта и проведено тестирование функциональных свойств на моделях *in vivo*.

Проведены исследования по установлению зависимости дозы внесения гидролизатов на органолептические и структурно-механические характеристики базового аэрированного продукта и обоснована необходимость дополнительно к имеющейся стабилизационной системе на основе желатина и гуаровой камеди (ГК) добавить тыквенный пектин, описанный в литературе как полисахарид, обладающий более выраженными бифидогенными и антиоксидантными свойствами, чем пектины, полученные из других источников.

В матрицу контрольного продукта взамен цельного молока были введены пептидные гидролизаты ГСБ 3 и ГСБ 5 в разных процентных соотношениях: 25, 50, 75 и 100%.

Показано, что замена цельного молока на ГСБ 3 и ГСБ 5 повышала АПФ-ингибирующую активность получаемых продуктов в 5 и 9 раз соответственно (IC_{50} 5,13 и 2,69 мг белка/мл по сравнению с 24 мг белка/мл в контрольном образце).

Однако при этом реологические показатели опытных образцов по сравнению с контрольным ухудшались, что свидетельствует о недостаточно стабильной системе, в дальнейшем не стойкой в хранении.

Для стабилизации структуры базовых аэрированных продуктов, обогащенных ГСБ 3 и ГСБ 5, в рецептуру с гуаровой камедью был дополнительно включен тыквенный пектин (таблица 13).

Таблица 13 – Рецептуры контрольного и опытных образцов аэрированных продуктов

Наименование компонента	Количество, г		
	Рецептура С 100 % ГК	Рецептура С1 50 % ГК : 50 % ТП	Рецептура С2 100 % ТП
Творог обезжиренный	40,0	40,0	40,0
Сливки 10% -ной жирности	11,65	11,65	11,65
Молоко 2,5%-ной жирности	34,14	34,14	34,14
Сахарный песок	10,7	10,7	10,7
СОМ	2,0	2,0	2,0
Желатин	0,83	0,83	0,83
Гуаровая камедь	0,42	0,21	-
Пектин тыквенный	-	0,21	0,42
Регулятор кислотности	0,26	0,26	0,26
ИТОГО	100	100	100

Увеличение дозы пектина приводило к излишне плотной консистенции продукта. Для оптимизации внутрикомпозиционного состава базовой аэрированной системы был проведен полнофакторный эксперимент с 2 переменными параметрами: массовая доля ГСБ 3 и 5, введенных поочередно взамен молока (X1 и X3 соответственно) и массовая доля тыквенного пектина в композиции системы гидроколлоидов (X2) (таблицы 14, 15).

Таблица 14 – Уровни вариации независимых параметров при полнофакторных экспериментах по оптимизации внутрикомпозиционного состава базовой аэрированной системы

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	+1
Массовая доля ГСБ 3/ГСБ 5, %	X1/X3	0	17,07	34,14
Массовая доля тыквенного пектина, %	X2	0	0,21	0,42

Таблица 15 – Композиционный план полнофакторного эксперимента с переменными массовой долей ГСБ 3, ГСБ 5 и тыквенного пектина

№	Входные параметры		Выходные параметры		
	X1/X3	X2	АПФ-ингибирующая активность, IC ₅₀ , мг белка/мл	Плотность, г/см ³	Степень тиксотропности, %
1	0	0	19,06	0,493	52
2	0	0,21	23,99	0,648	59
3	0	0,42	25,00	0,480	30
4	17,07	0	12,02/17,38	0,427/0,501	15/47
5	17,07	0,21	6,03/5,62	0,471/0,582	21/26
6	14,07	0,42	5,37/7,08	0,618/0,590	41/88
7	34,14	0	7,56/5,71	0,306/0,419	31/42
8	34,14	0,21	2,69/5,13	0,408/0,404	12/76
9	34,14	0,42	4,27/3,89	0,579/0,585	25/56

Анализ зависимостей АПФ-ингибирующей активности, плотности и тиксотропности от переменных параметров показывает, что с возрастанием м.д. ГСБ 3 и тыквенного пектина значение IC₅₀ (т.е. АПФ ингибирующая активность возрастает) и плотности базового аэрированного продукта снижается, а с увеличением м.д. пектина наоборот плотность продукта увеличивается. Тыквенный пектин практически не влияет на тиксотропность продукта, а увеличение параметра м.д. ГСБ 3 приводит к негативному явлению – снижению степени тиксотропности. Были проанализированы профили желательности оптимизационной модели исходя из ранжирования выходных параметров и показано, что оптимальные условия, удовлетворяющие требованиям разрабатываемого базового аэрированного продукта, выполняются при полной замене молока на ГСБ 3 совокупно с частичной заменой гуаровой камеди на тыквенный пектин (0,14 из 0,42). При этом прогнозируемая АПФ-ингибирующая активность составит IC₅₀ 5,88, мг белка/мл, плотность 0,380 г/см³ и тиксотропность 21% (таблица 16). Наибольший эффект на увеличение АПФ-ингибирующей активности оказывает фактор увеличения м.д. ГСБ 5 при этом влияние фактора м.д. тыквенного пектина крайне незначительно. В отличие от ГСБ 3, ГСБ 5 на параметр плотности продукта оказывает значительно меньшее влияние. Плотность изменяется в основном за счет увеличения дозы тыквенного пектина. При этом на величину степени тиксотропности оказывают

незначительное влияние оба фактора. Оптимальные соотношения компонентов подбирали исходя из профилей желательности, учитывая ранжирование выходных параметров. Так оптимальные значения АПФ-ингибирующей активности, плотности и тиксотропности достигается при полной замене молока на ГСБ 5 и частичной (0,27 из 0,42) замене гуаровой камеди в стабилизационной системе на тыквенный пектин. Прогнозируемая АПФ-ингибирующая активность составит IC_{50} 4,11, мг белка/мл, плотность 0,492 г/см³ и тиксотропность 62% (таблица 16).

Таблица 16 – Прогнозируемые выходные параметры оптимизации внутрикомпозиционного состава системы базового продукта

Входные параметры			Прогнозируемые выходные параметры		
X1	X2	X3	АПФ-ингибирующая активность, IC_{50} , мг белка/мл	Плотность, г/см ³	Степень тиксотропности, %
34,14	0,14	-	5,88	0,380	21
-	0,27	34,14	4,11	0,492	62

По результатам исследования в качестве основного функционального ингредиента в технологии базового аэрированного продукта по совокупности исследуемых свойств был выбран ГСБ 3 в количестве внесения в рецептуру 34,14 %; массовая доля пектина – 0,14%.

По принципу локализации координат частного продукта в пространстве связанных однородной технологической цепочкой пищевых систем, была разработана группа молочной продукции, в том числе мусс, являвшийся технологически идентичным базовому продукту.

Далее были отработаны технологические режимы получения аэрированного продукта с использованием гидродинамического измельчителя-диспергатора ГИД-100/1.

Таблица 17 – Распределения газовых агломератов при различном межцилиндровом зазоре ($\bar{X} \pm m$; $m \leq 0,05$)

Δ , мм	Распределение газовых агломератов, %			
	менее 1	1-3	3-5	более 5
0,10	100	0	0	0
0,44	58	29	10	0
0,78	26	37	31	2
1,12	0	21	57	19
1,46	0	10	29	58
1,80	0	4	14	79

При его использовании свойства газодисперсной системы можно регулировать путем изменения величины зазора между боковыми поверхностями ротора и статора, а также градиент скорости оборотов

роторного устройства. Была исследована структура продукта при различной величине зазора ротор/статор (Δ), где критерием оценки служили размер и относительное распределение пузырьков в объеме продукта (таблица 17).

Были исследованы пенообразующие свойства мусса, а именно плотность в зависимости от частоты вращения ротора (n) и продолжительности газонаполнения (τ), результаты представлены таблице 18.

Таблица 18 – Плотность мусса в зависимости от частоты вращения ротора и продолжительности газонаполнения

№ опыта	τ , мин	об/мин	Δ , мм	ρ , г/см ³
1	1	600	0,1	0,469
2	3	1200	0,1	0,373
3	1	1200	0,1	0,427
4	3	600	0,1	0,402

В шестой главе описано тестирование *in vivo* на моделях индуцированного окислительного стресса, показаны антиоксидантные и гепатопротекторные свойства мусса, результаты представлены в таблице 19.

Показано, что на фоне приема как контрольных, так и опытных образцов продуктов у животных отмечалось снижение содержания ТБК-реактивных продуктов в печени, по сравнению с контрольной группой с интоксикацией. При этом наибольшее снижение отмечено у групп, получавших опытные образцы творожного мусса (таблица 19).

Таблица 19 – Показатели антиоксидантного статуса лабораторных животных при тестировании антиоксидантных и гепатопротекторных свойств мусса *in vivo*

Показатель	Группа			
	№1	№2	№3	№4
АОЕ, кровь, мМ ТЭ	8,1±0,4	8,6±0,8	8,3±0,4	7,8±0,4
ТБК-реакт. прод, кровь мкМ, МДА	2,8±0,4	3,2±0,5	2,7±0,4	2,5±0,4
ТБК-реакт. прод, печень нМ, МДА/г	34,6±4,7	56,5±3,3	48,3±4,8	44,7±3,9
АЛТ, Ед/л	33,0±4,2	30,0±3,3	34,3±2,4	28,2±2,6
АСТ, Ед/л	119,1±13,5	104,8±13,6	108,3±6,9	126,1±11,0
ЛДГ, Ед/л	1196±166	1102±134	1432±179	1404±116

Группа №1- интактная, ОР, №2 - ОР +2мл вода, 1 день 0,5 мл/кг стерильного рафинированного и дезодорированного подсолнечного масла; № 3,4 - 1 день 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированном подсолнечном масле (2:5 об. /об.), №3 - ОР +2мл мусс контроль; №4 – ОР+мусс

Содержание ТБК-реактивных продуктов в печени у животных получавших опытные образцы продуктов было достоверно ($p < 0,05$) ниже на 20 % по сравнению с контрольной группой №2 животных с интоксикацией (таблица 19).

По анализу активности ЛДГ и АЛТ в сыворотке крови животных установлено, что все исследованные группы животных не имеют значимых отличий друг с другом. По активности АСТ 1-6 группы животных не имеют значимых отличий друг с другом. В целом во всех исследованных группах животных активность печеночных трансаминаз АЛТ и АСТ в сыворотке крови на 28 день эксперимента соответствует физиологической норме для крыс линии Wistar.

Таблица 20 – Результаты определения артериального давления (АД) у крыс SHR в начале и конце эксперимента

Группа, №	Систолическое АД, мм. рт. ст.			Диастолическое АД, мм. рт. ст.		
	В начале	В конце	ΔP	В начале	В конце	ΔP
Вода (Контроль)	166±15	200±19	+34	90±11	127±17	+37
Контрольный мусс	184±16	179±11	-5	110±13	110±5	0
Опытный мусс	188±15	170±16	-18	118±12	106±7	-12

Среднее систолическое давление у крыс на момент начала эксперимента составляло 176±12 мм рт. ст. (таблица 20). Показано статистически значимое снижение среднего систолического давления при внутрижелудочном введении опытных образцов мусса. Гипотензивный эффект для опытного образца мусса составил $\Delta P=18$ мм. рт. ст., а для контрольного образца всего лишь $\Delta P=5$ мм. рт. ст. (таблица 20).

На модели антибиотико-индуцированного дисбиоза на самцах крыс линии Wistar исследованы пребиотические свойства творожных муссов. Показано статистически достоверное увеличение примерно в 1,4 и 3,7 раза ($p<0,05$) относительного содержания лакто- и бифидобактерий соответственно в каловых массах экспериментальных животных, получавших на фоне приема антибиотика опытные образцы творожного мусса, в то время как контрольный мусс не продемонстрировал пребиотической активности вовсе (таблица 21).

Таблица 21 – Содержание лактобактерий и бифидобактерий в фекальных массах крыс в модели антибиотикоиндуцированного дисбиоза

Номер группы	Количество бифидобактерий, КОЕ/г feces	Количество лактобактерий, КОЕ/г feces
0 (интактный контроль)	9,0x10 ⁸	8,8x10 ⁸
1 (отрицательный контроль антибиотик+вода)	1,5x10 ⁸	4,0x10 ⁸
4 (антибиотик+ контрольный мусс)	1,0x10 ⁸	5,0x10 ⁸
5 (антибиотик+ опытный мусс)	5,5x10 ⁸	5,4x10 ⁸

На модели с повышенной алиментарной липидной нагрузкой на самцах крыс линии Wistar исследованы гипохолестеринемические свойства опытного образца мусса, по сравнению с контрольным образцом. Показано статистически значимое снижение сывороточной концентрации

триглицеридов на 51,4% ($p < 0,01$), концентрации общего холестерина в сыворотке крови на 8,6% ($p < 0,05$), а также значимое ($p < 0,05$) снижение концентрации атерогенной фракции липопротеидов ЛПНП в сыворотке крови животных, получавших опытный образец мусса, по сравнению с величинами данных показателей в контрольной группе (таблица 22).

Таблица 22 – Результаты тестирования липидного профиля сыворотки крови у экспериментальных животных различных групп

Показатель	Группы			
	№1 (n=10)	№2 (n=10)	№3 (n=10)	№4 (n=10)
Холестерин, мМ	2,20±0,12	2,68±0,07	2,57±0,10	2,45±0,16
ЛПВП*, мг/дл	26,16±1,03	30,51±0,99	24,99±2,03	26,55±1,08
ЛПНП**, мг/дл	31,09±0,94	32,28±1,22	29,15±1,52	27,38±1,25
Триглицериды, мМ	0,33±0,04	0,48±0,05	0,44±0,06	0,35±0,06

*- липопротеины высокой плотности; **- липопротеины низкой плотности

Таким образом, в различных моделях *in vivo* показано, что разработанные продукты на основе пептидных гидролизатов сывороточных белков молока обладают функциональными свойствами, такими как антиоксидантные и гепатопротекторные, гипотензивные, гипохолестеринемические и бифидогенные.

В седьмой главе представлены исследования по интегрированию полученного функционального продукта в частные технологии обогащенных молочных продуктов. В качестве основы при разработке частных технологий были использованы разработанные ранее рецептуры без использования гидролизатов. При получении всех образцов в продуктах оценивали органолептические и реологические характеристики.

С использованием ГСБ 3 получено ещё пять видов обогащенных продуктов. При получении мусса и суфле различался рецептурный состав компонентов, а при получении крема (рецептура аналогичная) отсутствовала операция «аэрирование» и достаточно длительный процесс созревания.

В таблице 26 представлены рецептуры группы однородных молочных и творожных продуктов, обогащенных гидролизатом сывороточных белков, а также контрольных образцов без внесения гидролизата и пектина.

После приготовления образцов была проведена органолептическая оценка контрольных и экспериментальных образцов обогащенных продуктов (рисунок 7).

Как видно из данных профилограммы, практически по всем показателям экспериментальный образец мусса был близок к контрольному, наибольшие отклонения отмечены дегустаторами в дескрипторе «цвет» (рисунок 7, а). Как и в случае творожного мусса, в случае суфле, дегустаторы отметили более низкими баллами показатель «цвет».

Таблица 26 – Рецептуры обогащенных продуктов

Наименование компонента	Количество, г на 100 г									
	Мусс (крем)		Суфле		Паста		Напиток		Кисель	
	К*	Э**	К	Э	К	Э	К	Э	К	Э
Творог обезжиренный	40,00	40,00	57,30	57,30	-	-	-	-	-	-
Творог 5%-ной жирности	-	-	-	-	48,00	48,00	-	-	-	-
Сливки 10% -ной жирности	11,65	11,65	13,90	7,60	-	-	15,50	15,50	-	-
Молоко 2,5%-ной жирности	-	-	10,20	-	39,66	-	62,00	25,00	72,33	-
Гидролизат 3	34,14	34,14	-	16,4	-	39,66	-	37,00	-	72,33
Сок вишневый	-	-	-	-	-	-	10,00	10,00	-	-
Пюре яблочное	-	-	-	-	-	-	8,00	8,00		
Наполнитель фруктово-ягодный	--	-	-	-	-	-	-	-	22,90	22,90
Какао-порошок	-	-	-	-	-	-	2,50	2,50	-	-
Сахарный песок	10,70	10,70	12,30	12,30	-	-				
Сахарный песок	-	-	-	-	10,54	10,54	-	-	-	-
Ванилин	-	-	-	-	-	-	1,00	1,00		-
СОМ	2,00	2,00	4,20	4,20	-	-	-	-		
Сыворотка молочная сухая	-	-	-	-	-	-	-	-	4,20	4,20
Желатин	0,83	0,83	0,67	0,60	-	-	-	-	-	-
Крахмал горячего набухания	-	-	-	-	1,10	1,10	-	-	-	-
Крахмал холодного набухания	-	-	-	-	-	-	-	-	0,45	0,45
Камедь рожкового дерева	-	-	0,45	0,40	-	-	-	-	-	-
Агар-агар	-	-	0,28	0,25	-	-	-	-	-	-
æ-каррагинан	-	-	-	0,11	-	-	0,20	0,2	-	-
Гуаровая камедь	0,42	0,28	-	-	0,43	0,23			-	
Пектин тыквенный	-	0,14	-	0,14	-	0,20	-	0,18	-	0,12
Пектин цитрусовый	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-
Лимонная кислота	-	-	-	-	-	-	0,30	0,03	-	-
Натрий двууглекислый	0,26	0,26	-	-	0,27	0,27	-	-	-	-
Цитрат натрия	-	-	0,70	0,70	-	-	0,50	0,50	-	-

К* - контрольные образцы Э** - экспериментальные образцы

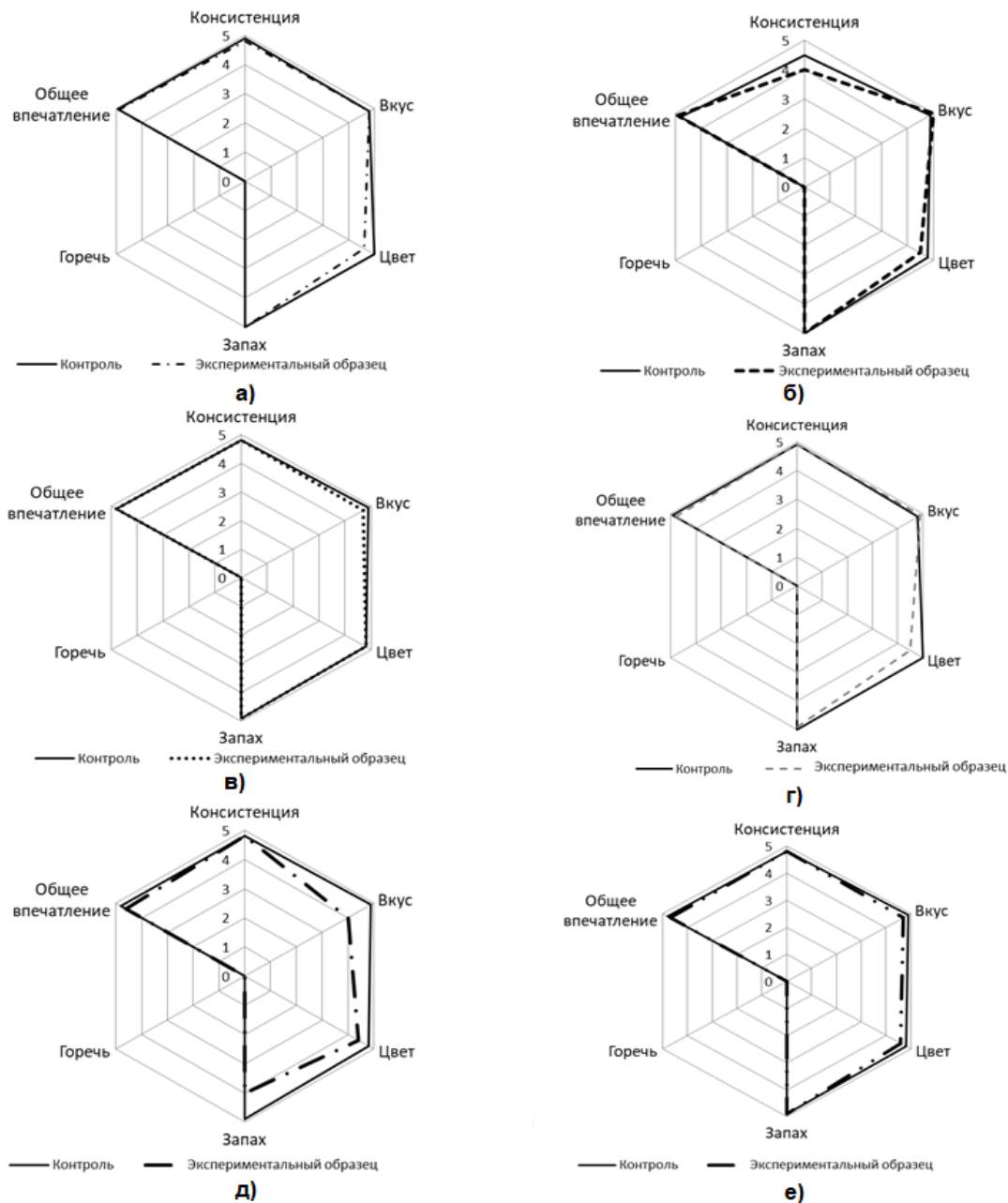


Рисунок 7 – Профилограммы органолептической оценки контрольных и экспериментальных образцов:

а) муссы б) суфле в) пасты г) напитки д) кисели е) кремы

Также по сравнению с контрольным образцом консистенция продукта была оценена ниже, но при этом общее впечатление от продукта было на 0,1 балла выше. Это связано с тем, что экспериментальный образец имел более воздушную, но при этом стабильную консистенцию, что подтвердили результаты проведенных далее реологических исследований (рисунок 7, б), б). Оценка органолептического профиля контрольного и экспериментального образца паст показала, что практически по всем показателям образец со 100 %-ной заменой молока на гидролизат с добавлением пектина практически не уступал по бальной оценке контрольному образцу (рисунок 7, в). Как видно из данных профилограммы рисунка 7, г), образцы с внесением гидролизата в

напиток имели достаточно привлекательные органолептические характеристики, максимально приближенные к контрольному образцу. Как и в случае вышеописанных продуктов, наибольшие отличия по сравнению с контролем зафиксированы в показателе «цвет». В случае киселя обогащенного претензии дегустаторов коснулись не только цвета, но и вкуса и запаха. Экспериментальные образцы отличались резким сывороточным вкусом и запахом, которые не нивелировались вкусо-ароматической добавкой (рисунок 7, д). Поэтому были проведены дополнительные исследования по внесению гидролизата в рецептуру киселя с осуществлением замены молока на гидролизат от 10 до 90 % с шагом 10. По результатам эксперимента было установлено, что без ущерба вкусовым характеристикам возможна 40 % –ная замена молока на гидролизат.

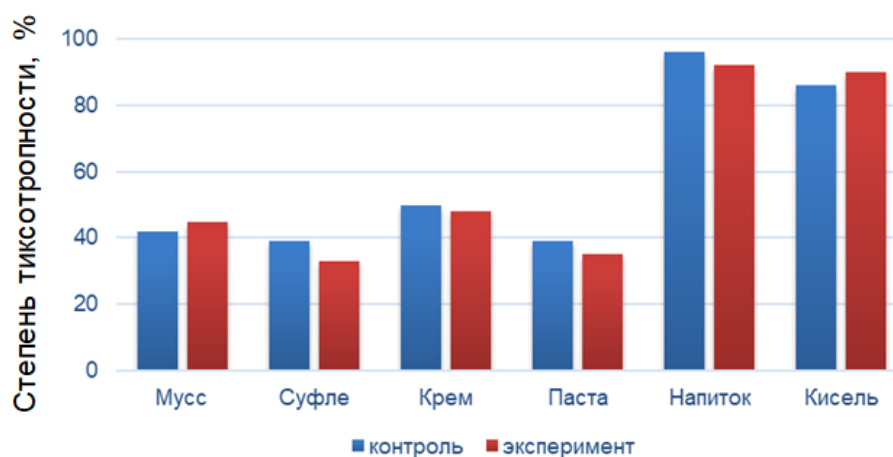


Рисунок 8 – Реологические характеристики контрольных и экспериментальных образцов

Оценка степени тиксотропности экспериментальных образцов обогащенных молочных и творожных продуктов в сравнении с контрольными показала, что внесение гидролизата и тыквенного пектина не только не ухудшало, но и в некоторых случаях и немного улучшало структурно-механические характеристики, о чем свидетельствуют данные по определению степени тиксотропности, представленные на рисунке 8.

По результатам работы, представленной в данной главе, разработана общая технологическая схема получения обогащенных продуктов (рисунок 9).

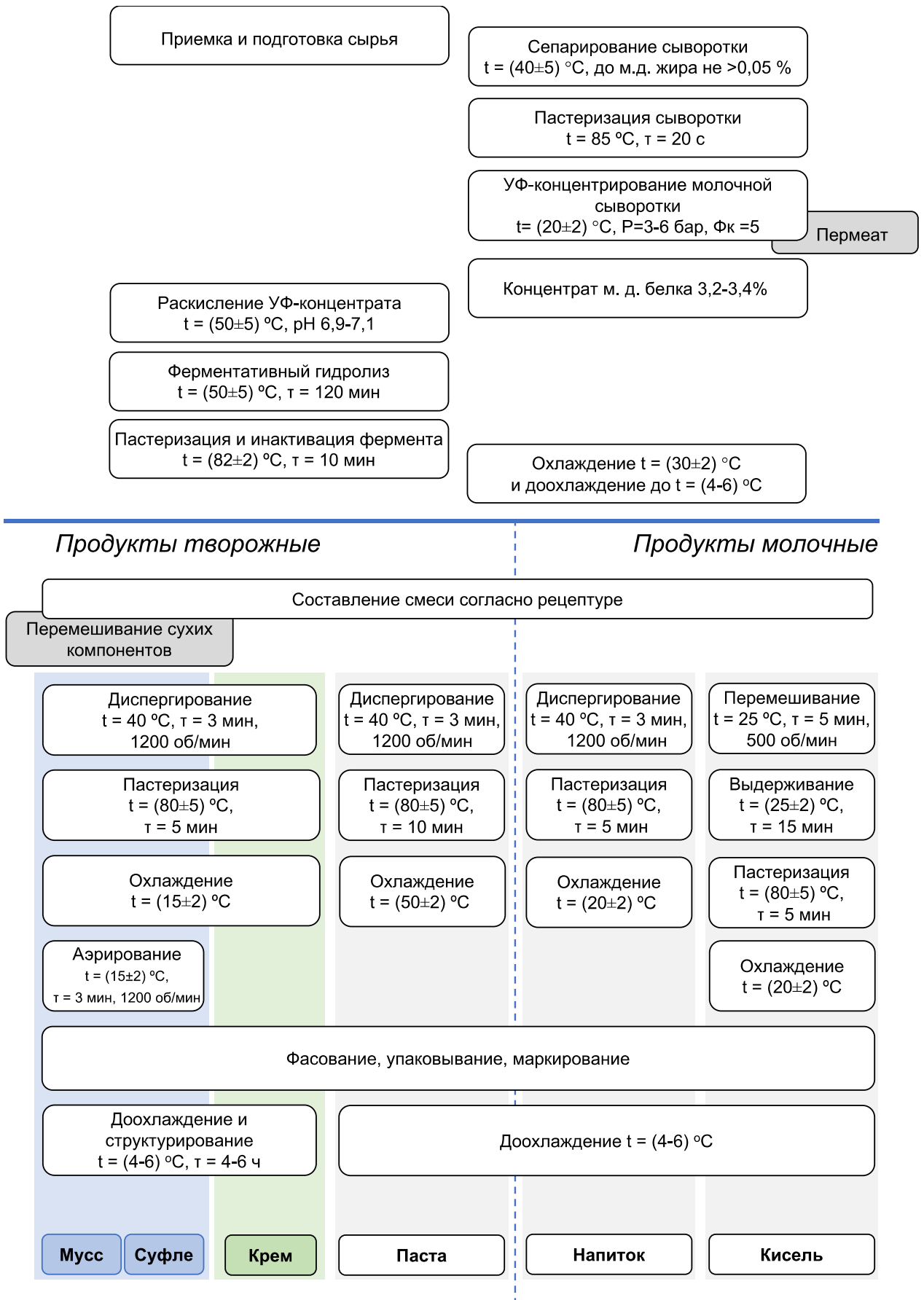


Рисунок 9 – Технологическая схема получения обогащенных продуктов (УФ – ультрафильтрация, Фк – фактор концентрирования)

Основные результаты и выводы

1. Сформулирован концептуальный подход к направленной трансформации молочного сырья для усиления функционального потенциала беков молока с последующим созданием на их основе функциональных продуктов и ингредиентов.

2. Установлены закономерности изменения белкового профиля сывороток, полученных при различных способах коагуляции сгустка: при кислотно-сычужном и термокислотном. В первом случае белковый профиль представлен преимущественно белками сывороточной фракции (α -лактальбумин и β -лактоглобулин), во втором случае фракциями β -, α - и κ -казеина, сывороточные белки составляют 24 %. При исследованных способах коагуляции в сыворотках не выявлено различий в содержании горьких аминокислот.

3. Исследование *in silico* показало, что пептиды с наиболее высокой антигипертензивной активностью (KW) были обнаружены при применении химотрипсина С (IC_{50} 1,63 мМ) и субтилизина (VF и VY) – (IC_{50} 7,1 и 9,2 мМ). Наименьшее количество горьких пептидов ($AE=0,0124$) зафиксировано в трипсиновых гидролизатах, наибольшее ($AE=0,1429$) – в гидролизатах, полученных с протеиназой К.

4. Был разработан алгоритм системного анализа протеолитических ферментов с интегрированием таких выходных параметров работы фермента, как ингибирование АПФ, ДПП IV; антиоксидантная активность, свободных аминокислот и количество горьких пептидов. Наиболее оптимальными по интегральному показателю оказались химотрипсин С ($C_j=0,314$) и субтилизин ($C_j=0,284$). Однако наличие в гидролизатах химотрипсина С аллергенных эпитопов ограничивает его использование для получения функциональных ингредиентов. Для каппа-казеина оптимальными являлись термолизин ($C_j=0,434$) и субтилизин ($C_j=0,371$).

5. Установлены оптимальные параметры протеолиза сывороток: сыворотка №1 – τ 94,8 мин, E/C (Prot/Alc) 3,25/0,75 %; №2 и №4 – τ 90 мин, E/C (Prot/Alc) 3,00/1,00 %; №3 – τ 120 мин, E/C (Prot/Alc) 3,88/0,12 %; №5 – τ 121,2 мин, E/S (Prot/Therm/Alc) 2,00/1,00/1,00 %. При данных условиях и соблюдении режимов оптимума действия ферментного препарата получены гидролизаты с минимальным САК (от 2,94 до 11,92 %), СГ составила от 6,00 до 14,40 %, средняя антиоксидантная активность 461,36 мкмоль ТЭ/ г белка. С помощью разработанной модели равновесия – модифицированного уравнения Михаэлиса-Мэнтен – осуществлено прогнозирование АОЕ ГСБ с учетом вариабельности параметров процесса гидролиза в условиях производства.

6. Показано, что в гидролизатах подсырных сывороток кислотно-сычужной коагуляции происходит значительное снижение доли высокомолекулярной фракции (>10 кДа) в сторону средне (3-10 кДа) и низкомолекулярной (<3 кДа) фракций, с преобладанием среднемолекулярной фракции (от 47% до 58%). В то время, как в гидролизате кислотной коагуляции, практически отсутствует высокомолекулярная фракция (>10

кДа), при этом доля средне- и низкомолекулярной фракции составляет 40,87% и 55,08%. Анализ последовательностей, идентифицированных с помощью базы данных BIONEER пептидов, позволил установить присутствие в составе всех гидролизатов антиоксидантных и гипотензивных фрагментов.

7. Охарактеризована АОЕ всех гидролизатов, она составила 400-600 мкМ ТЭ/г белка. Показана антимикробная активность ГСБ в отношении тест-штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Установлено, что наиболее выраженной антимикробной активностью обладали ГСБ 3 (гидролизат сыворотки от твердых сыров) и ГСБ 5 (гидролизат сыворотки от мягкого сыра без созревания), что коррелирует с данными *in silico* прогнозирования. На *in vivo* модели на фоне приема ГСБ у животных показана тенденция к снижению величины ТБК-реактивных продуктов в печени, выявлен бифидогенный и гипотензивный эффект (снижение артериального давления на 27 мм. рт. ст.).

8. Выявлено, что интегрирование ГСБ 3 и ГСБ 5 взамен цельного молока в матрицу базового продукта негативно повлияло на реологические и органолептические показатели, но при этом 100%-ная замена привела к повышению АПФ-ингибирующей активности базового (аэрированного) продукта в 5 и 9 раз соответственно (IC₅₀ 5,13 и 2,69 мг белка/мл по сравнению с 24 мг белка/мл в контрольном образце). По итогам полнофакторного эксперимента были установлены оптимальные дозы внесения ГСБ 3, выбранного по результатам комплексной оценки, и стабилизационной системы (тыквенного пектина) – 34,14 % и 0,14 %, соответственно.

9. Показано, что на фоне приема образцов мусса с ГСБ 3 у животных содержание ТБК-реактивных продуктов в было ниже на 20 % по сравнению с группой №2 с интоксикацией. Гипотензивный эффект на 30 день эксперимента для опытного образца мусса составил $\Delta P=18$ мм. рт. ст., а для контрольного образца $\Delta P=5$ мм. рт. ст. Показано статистически достоверное увеличение – в 1,4 и 3,7 раза ($p<0,05$) относительного содержания лакто- и бифидобактерий соответственно в каловых массах экспериментальных животных, получавших на фоне приема антибиотика опытные образцы мусса. На модели с повышенной алиментарной липидной нагрузкой показано снижение сывороточной концентрации триглицеридов на 51,4 %, концентрации общего холестерина в сыворотке крови на 8,6 %, а также снижение концентрации атерогенной фракции липопротеидов ЛПНП на фоне приема мусса.

10. С использованием ГСБ 3 с доказанными биологическими эффектами было получено пять видов обогащенных продуктов. Оценка степени тиксотропности экспериментальных образцов обогащенных молочных и творожных продуктов в сравнении с контрольными показала, что внесение гидролизата и стабилизационной системы улучшало структурно-механические характеристики новых продуктов. Разработана общая технологическая схема получения обогащенных продуктов.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

Главы в монографиях и учебниках

1. **Агаркова, Е. Ю.** Современные технологические подходы к обогащению молочных продуктов / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева // Инновационные технологии обогащения молочной продукции (теория и практика). – Москва : Франтера, 2016. – С. 110-142.
2. Технологии и оборудование функциональных цельномолочных продуктов и молочных консервов / В. Д. Харитонов, Д. В. Харитонов, И. А. Макеева, Г. А. Донская, И. А. Радаева, **Е. Ю. Агаркова** [и др.] // Современные технологии функциональных пищевых продуктов. – Москва : ДеЛи плюс, 2018. – С. 99-132.
3. **Агаркова, Е. Ю.** Некоторые аспекты использования биокаталитических и мембранных технологий для разработки функциональных молочных продуктов / **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева // Идеи академика Владимира Дмитриевича Харитонova в наукоемких технологиях переработки молока. – Москва : Федеральное государственное автономное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности", 2021. – С. 19-40.

Статьи в журналах, индексируемых в WoS/Scopus

4. Влияние нового кисломолочного продукта с гидролизатом сывороточных белков на переносимость и динамику проявлений атопического дерматита у детей с аллергией на белки коровьего молока / В. Д. Харитонов, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин [и др.] // Вопросы питания. – 2015. – Т. 84, № 5. – С. 56-63.
5. Cheese whey catalytic conversion for obtaining a bioactive hydrolysate with reduced antigenicity / A. Torkova, K. Ryazantzeva, **E. Y. Agarkova** [et al.] // Curr Res Nutr Food Sci. – 2016. – Vol. 4, No. SpecialIssue2. – P. 182-196. – DOI: <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.24>
6. Рациональный дизайн ферментных композиций для получения функциональных гидролизатов сывороточных белков коровьего молока / А. А. Торкова, К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова** [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 6. – С. 580-591. – DOI: <https://doi.org/10.7868/S0555109917060137>.
7. Whey protein hydrolysate and pumpkin pectin as nutraceutical and prebiotic components in a functional mousse with antihypertensive and bifidogenic properties / **E. Y. Agarkova**, A. G. Kruchinin, O. A. Glazunova, T. V. Fedorova // Nutrients. – 2019. – Vol. 11, No. 12. – P. 2930. – DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11122930>.
8. Directional proteolysis of secondary raw materials / N. A. Zolotarev, O. B. Fedotova, **E. Yu. Agarkova** [et al.] // NATL ACAD SCI REPUBLIC KAZAKHSTAN – 2020. – No. 5. – P. 77-84. – DOI: <https://doi.org/10.32014/2020.2518-1491.83>.

9. Processing cottage cheese whey components for functional food production / **E. Agarkova**, A. Kruchinin, N. Zolotaryov [et al.] // *Foods and Raw Materials*. – 2020. – Vol. 8, No. 1. – P. 52-59. – DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-52-59>.

10. **Агаркова, Е. Ю.** Противодиабетическая активность белков молочной сыворотки / **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин // *Техника и технология пищевых производств*. – 2020. – Т. 50, № 2. – С. 306-318. – DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-2-306-318>.

11. Hypotensive and hepatoprotective properties of the polysaccharide-stabilized foaming composition containing hydrolysate of whey proteins / A. G. Kruchinin, **E. Y. Agarkova**, O. S. Savinova [et al.] // *Nutrients*. – 2021. – Vol. 13, No. 3. – P. 1031. – DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13031031>.

12. Ryazantseva, K. A. Continuous hydrolysis of milk proteins in membrane reactors of various configurations / K. A. Ryazantseva, **E. Yu. Agarkova**, O. B. Fedotova // *Foods and Raw Materials*. – 2021. – Vol. 9, No. 2. – P. 271-281. – DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-271-281>.

13. **Agarkova, E. Y.** The prospect of using natural psychobiotics in dairy products to stabilize the diet / **E. Y. Agarkova**, O. Fedotova, and A. Chilikin // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2021. – Vol. 677. – №. 3. – P. 032051. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/677/3/032051>.

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

14. Творожный продукт для питания людей с проявлениями аллергии на молочные белки / А. Г. Кручинин, Е. Ю. Агаркова, К. А. Рязанцева [и др.] // *Техника и технология пищевых производств*. – 2014. – № 4(35). – С. 126-132.

15. Применение баромембранных процессов в технологии йогурта функциональной направленности / К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова**, В. Д. Харитонов // *Хранение и переработка сельхозсырья*. – 2015. – № 5. – С. 36-41.

16. Золотарев, Н. А. Аэрированный творожный эмульсионный продукт с гидролизатом сывороточных белков / Н. А. Золотарев, О. Б. Федотова, **Е. Ю. Агаркова** // *Молочная промышленность*. – 2018. – № 8. – С. 52-54. – DOI: <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2018-8-52-54>.

17. **Агаркова, Е. Ю.** Ферментативная конверсия как способ получения биологически активных пептидов / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин // *Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета*. – 2018. – Т. 21, № 3. – С. 412-419. – DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419>.

18. **Агаркова, Е. Ю.** Разработка процесса биокаталитической конверсии компонентов молочной сыворотки / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин // *Пищевая промышленность*. – 2019. – № 4. – С. 16-17. – DOI: <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10006>.

19. Перспективы использования динамического мембранного модуля фильтрации UF-RDM для концентрирования белков подсырной сыворотки / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, А. А. Агарков, В. Д. Харитонов // Сыроделие и маслоделие. – 2019. – № 6. – С. 54-56. – DOI: <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2019-6-54-56>.

20. **Агаркова, Е. Ю.** Белки молочной сыворотки как источник антиоксидантных пептидов / **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин // Сыроделие и маслоделие. – 2020. – № 2. – С. 57-58. – DOI: <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-2-55-56>.

21. **Агаркова, Е. Ю.** Актуальность получения антигипертензивных пептидов из молочной сыворотки / **Е. Ю. Агаркова**, Н. Е. Шерстнева // Пищевая промышленность. – 2020. – № 11. – С. 20-23. – DOI: <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10121>.

22. **Агаркова, Е. Ю.** Пенообразующие свойства гидролизатов сывороточных белков / **Е. Ю. Агаркова** // Вестник КрасГАУ. – 2020. – № 8(161). – С. 179-185. – DOI: <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-8-179-185>.

23. Агарков, А. А. Особенности органолептических профилей сывороточных напитков нетрадиционного состава / А. А. Агарков, О. Б. Федотова, **Е. Ю. Агаркова** // Пищевая промышленность. – 2020. – № 10. – С. 26-29. – DOI: <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10110>.

24. Коростелева, М. М. Принципы обогащения пищевых продуктов функциональными ингредиентами / М. М. Коростелева, **Е. Ю. Агаркова** // Молочная промышленность. – 2020. – № 11. – С. 6-8. – DOI: <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-11-6-8>.

25. Кручинин, А. Г. Биологически активные пептиды молока: обзор / А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова** // Пищевая промышленность. – 2020. – № 12. – С. 92-96. – DOI: <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10151>.

26. **Агаркова, Е. Ю.** Особенности технологии молочных продуктов, обогащенных сывороточными белками / **Е. Ю. Агаркова**, А. Ю. Чиликин // Молочная промышленность. – 2021. – № 3. – С. 49-51. – DOI: <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2021-03-49-51>.

27. Рязанцева, К. А. Использование методов *in silico* для получения биоактивных пептидов молочной сыворотки / К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова** // Пищевая промышленность. – 2021. – № 5. – С. 32-35. – DOI: <https://doi.org/10.52653/PPI.2021.5.5.007>.

28. **Агаркова, Е. Ю.** Роль протеолиза в формировании аэрированной текстуры в пищевых системах с использованием сывороточных пептидов / **Е. Ю. Агаркова**, А. Ю. Чиликин // Пищевая промышленность. – 2021. – № 8. – С. 44-46. – DOI: <https://doi.org/10.52653/PPI.2021.8.8.011>.

29. **Агаркова, Е. Ю.** Непрерывный протеолиз в аспекте использования потенциала сывороточных белков / **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева, Д. Н. Калугина // Молочная промышленность. – 2021. – № 7. – С. 40-42. – DOI: <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2021-07-40-42>.

30. Агарков, А. А. Перспективное направление переработки молочной сыворотки для получения сквашенных напитков с повышенной усвояемостью / А. А. Агарков, К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова** // Пищевая промышленность. – 2021. – № 9. – С. 16-18. – DOI: <https://doi.org/10.52653/PPI.2021.9.9.002>.

31. **Агаркова, Е. Ю.** Аэрированные продукты с производными белков молочной сыворотки / **Е. Ю. Агаркова** // Пищевая промышленность. – 2022. – № 3. – С. 24-27. – DOI: <https://doi.org/10.52653/PPI.2022.3.3.006>.

32. **Агаркова, Е.Ю.** Разработка программы системного анализа и выбора оптимальных ферментных препаратов для высвобождения биоактивных пептидов / **Е. Ю. Агаркова, В. К. Семипятный** // Пищевая промышленность. – 2023. – №2. – С.6-10.

Публикации в журналах, индексируемых в РИНЦ, и материалах конференций

33. Соколова, О. В. Стабилизаторы структуры для молокосодержащих продуктов / О. В. Соколова, Е. Ю. Агаркова // Молочная промышленность. – 2016. – № 7. – С. 62-63.

34. Агаркова, Е. Ю. Оптимизация состава эмульсионных пастообразных продуктов / Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева // Молочная промышленность. – 2016. – № 8. – С. 42-44.

35. Эмульгаторы в составе аэрированных молочных продуктов / В. Д. Харитонов, О. Б. Федотова, Е. Ю. Агаркова [и др.] // Молочная промышленность. – 2016. – № 10. – С. 56-57.

36. Золотарев, Н. А. Гидролизаты творожной сыворотки для творожных эмульсионных продуктов / Н. А. Золотарев, О. Б. Федотова, Е. Ю. Агаркова // Молочная промышленность. – 2017. – № 8. – С. 36-38.

37. Влияние модифицированных крахмалов на структуру аэрированных творожных муссов / К. А. Рязанцева, Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин [и др.] // Молочная промышленность. – 2017. – № 9. – С. 54-56.

38. Особенности трансформации биополимеров эмульсионных систем при их направленной биокаталитической конверсии и двустадийной мембранной фильтрации / В. Д. Харитонов, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы VIII Московского Международного Конгресса, Москва, 17–20 марта 2015 года / ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. Том Часть 1. – Москва: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», 2015. – С. 425-426.

39. Исследование стабильности белковых аэрированных систем на основе гидролизованных пептидов / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева, О. Б. Федотова // Пищевые инновации и биотехнологии : Материалы Международной научной конференции, Кемерово, 28 апреля 2015 года / ФГБОУ ВО "КемТИПП". – Кемерово: КемТИПП, 2015. – С. 15-17.

40. Кручинин, А. Г. Особенности трансмембранного концентрирования пастообразных продуктов, полученных с использованием биокаталитической конверсии молочных белков / А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева // Пищевые инновации и биотехнологии : Материалы Международной научной конференции, Кемерово, 28 апреля 2015 года / ФГБОУ ВО "КемТИПП". – Кемерово: КемТИПП, 2015. – С. 93-96.

41. **Агаркова, Е. Ю.** Разработка стабилизационного комплекса для обеспечения стойкости аэрированных эмульсионных систем на основе гидролизованных пептидов / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева // Инновации в интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции : материалы Международной научно-практической конференции, Волгоград, 17–18 июня 2015 года / ГНУ НИИММП; ВолгГТУ. – Волгоград: ООО "Сфера", 2015. – С. 496-500.

42. Кручинин, А. Г. Исследование процесса баромембранного концентрирования эмульсионных продуктов с гидролизатом сывороточных белков / А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева // Инновации в интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции : материалы Международной научно-практической конференции, Волгоград, 17–18 июня 2015 года / ГНУ НИИММП; ВолгГТУ. – Волгоград: ООО "Сфера", 2015. – С. 503-508.

43. **Агаркова, Е. Ю.** Перспективы использования тыквенных волокон в кисломолочных продуктах / **Е. Ю. Агаркова**, К. Ш. Зунукова, С. В. Карпычев // День науки : Общеуниверситетская научная конференция молодых учёных и специалистов, Москва, 21–22 апреля 2015 года. Том Часть 10. – Москва: ФГБОУ ВП «МГУПП», 2015. – С. 12-14.

44. Максимов, А. А. Исследование реологических свойств творожного продукта с пищевыми волокнами / А. А. Максимов, Н. А. Тихомирова, **Е. Ю. Агаркова** // День науки : Общеуниверситетская научная конференция молодых учёных и специалистов, Москва, 21–22 апреля 2015 года. Том Часть 10. – Москва: ФГБОУ ВП «МГУПП», 2015. – С. 75-78.

45. **Агаркова, Е. Ю.** Особенности ценообразования гидролизованных молочных систем / **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Березкина, А. Г. Кручинин // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела : материалы V Международной научно-практической конференции, Ставрополь, 21–23 октября 2015 года / СКФУ. – Ставрополь: СКФУ, 2015. – С. 7-9.

46. Рязанцева, К. А. Использование белков молочной сыворотки как функционального пищевого ингредиента в технологии кисломолочного напитка / К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела : материалы V Международной научно-практической конференции, Ставрополь, 21–23 октября 2015 года / СКФУ. – Ставрополь: СКФУ, 2015. – С. 347-349.

47. Харитонов, Д. В. Анализ некоторых направлений снижения аллергенности белковых фракций молока / Д. В. Харитонов, **Е. Ю.**

Агаркова, Т. Н. Головач // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела : материалы V Международной научно-практической конференции, Ставрополь, 21–23 октября 2015 года / СКФУ. – Ставрополь: СКФУ, 2015. – С. 381-383.

48. Кручинин, А. Г. Использование протеолиза белков молока при разработке молочных продуктов со сниженной аллергенностью / А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова** // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. – 2015. – № 1. – С. 289-291.

49. **Агаркова, Е. Ю.** Применение гидроколлоидов различного типа для устойчивости трансформированных белковых систем / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности : Сборник научных трудов, Москва, 31 января 2015 года / ФГБНУ «ВНИМИ». – Москва: ВНИМИ, 2015. – С. 9-13.

50. Создание основы эмульсионного продукта с функциональными свойствами / Н. А. Золотарев, **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности : Сборник научных трудов, Москва, 31 января 2015 года / ФГБНУ «ВНИМИ». – Москва: ВНИМИ, 2015. – С. 60-64.

51. Кручинин, А. Г. Особенности двухстадийного концентрирования гидролизированных белков молочной сыворотки на ультрафильтрационной установке циркуляционного типа / А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности : Сборник научных трудов, Москва, 31 января 2015 года / ФГБНУ «ВНИМИ». – Москва: ВНИМИ, 2015. – С. 68-73.

52. **Агаркова, Е. Ю.** Актуальность использования гидролизированных сывороточных пептидов при создании функциональных молочных продуктов / **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности : Сборник научных трудов, Москва, 31 января 2015 года / ФГБНУ «ВНИМИ». – Москва: ВНИМИ, 2015. – С. 13-17.

53. Кручинин, А. Г. Творожный продукт с гидролизатом сывороточных белков полученный методом ультрафильтрации сквашенного казеина / А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова** // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности : Сборник научных трудов, Москва, 31 января 2015 года / ФГБНУ «ВНИМИ». – Москва: ВНИМИ, 2015. – С. 73-77.

54. Подбор ферментов для получения гидролизата молочных белков с привлекательными органолептическими свойствами / Н. Е. Шерстнева, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль

качества и безопасности : Сборник научных трудов, Москва, 31 января 2015 года / ФГБНУ «ВНИМИ». – Москва: ВНИМИ, 2015. – С. 268-272.

55. Кручинин, А. Г. Подбор заквасочных культур для сквашивания эмульсионной молочно-растительной системы / А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности : Сборник научных трудов, Москва, 31 января 2015 года / ФГБНУ «ВНИМИ». – Москва: ВНИМИ, 2015. – С. 77-83.

56. Исследование реологических свойств функционального эмульсионного кисломолочного продукта / К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, Н. Е. Шерстнева // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности : Сборник научных трудов, Москва, 31 января 2015 года / ФГБНУ «ВНИМИ». – Москва: ВНИМИ, 2015. – С. 223-227.

57. Кручинин, А. Г. Особенности создания творожных продуктов с пониженной аллергенностью на основе модифицированных белковых систем / А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова**, К. А. Рязанцева // Инновационные пищевые технологии в области хранения и переработки сельскохозяйственного сырья: фундаментальные и прикладные аспекты : Материалы VI Международной научно-практической конференции , Анапа, 26–28 мая 2016 года / Под общей редакцией Е.П. Викторовой. – Анапа: Ассоциация «Технологическая платформа «Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания», 2016. – С. 114-120.

58. Рязанцева, К. А. Аэрированные творожные продукты с белковыми концентратами / К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин // Молочная река. – 2016. – № 3(63). – С. 34-35.

59. **Агаркова, Е. Ю.** К вопросу формирования структуры взбитых творожных продуктов / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева // Переработка молока. – 2016. – № 11(205). – С. 46-49.

60. Рязанцева, К. А. Функциональный кисломолочный продукт с сывороточным гидролизатом / К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин // Молочная река. – 2016. – № 4(64). – С. 48-49.

61. **Агаркова, Е. Ю.** Исследование процесса гидролиза молочной сыворотки ферментами группы нейтральных протеаз / **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов, Москва, 26 апреля 2016 года / ВНИИПБТ; Под редакцией В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. – Москва: ГНУ ВНИИПБТ РАСХН, 2016. – С. 50-56.

62. Создание функционального творожного мусса обогащенного биологически активными гидролизатами сывороточных белков молока / К. А. Рязанцева, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин [и др.] // Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи : материалы Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием,

Москва, 12–13 октября 2017 года. – Москва: ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 2017. – С. 217-220.

63. **Агаркова, Е. Ю.** Использование гидролизатов молочной сыворотки при разработке функциональных продуктов / **Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева** // Переработка молока. – 2017. – № 8(214). – С. 16-19.

64. Кручинин, А. Г. Использование мембранных технологий при концентрировании вторичного молочного сырья / А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова** // Переработка молока. – 2017. – № 12(218). – С. 54-55.

65. Кручинин, А. Г. Различные подходы к формированию функциональных свойств молочных продуктов / А. Г. Кручинин, **Е. Ю. Агаркова** // Переработка молока. – 2018. – № 5(223). – С. 36-39.

66. **Агаркова, Е. Ю.** Новые виды крахмалов в функциональных молочных продуктах / **Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин** // Переработка молока. – 2018. – № 6(224). – С. 50-51.

67. **Агаркова, Е. Ю.** Перспективы использования гидролизатов сывороточных белков в рецептурах молочных напитков / **Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, Н. Е. Шерстнева** // Переработка молока. – 2019. – № 7(237). – С. 10-11. – DOI: <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2019-7-10-11>.

68. **Агаркова, Е. Ю.** Исследования параметров биокаталитической конверсии белково-углеводных систем в зависимости от состава ферментных комплексов / **Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин** // Переработка молока. – 2019. – № 11(241). – С. 48-50. – DOI: <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2019-11-48-50>.

69. Ферментативная обработка как инструмент придания функциональных свойств белкам молочной сыворотки / **Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева, Н. С. Пряничникова** // Аграрно-пищевые инновации. – 2019. – № 4(8). – С. 81-88. – DOI: <https://doi.org/10.31208/2618-7353-2019-8-81-88>.

70. Повышение функциональных свойств белков молочной сыворотки путем ферментативного гидролиза / **Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева, Н. Е. Шерстнева** // Переработка молока. – 2020. – № 2(244). – С. 16-19. – DOI: <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2020-02-16-18>.

71. Производственный участок мелкосерийного типа на базе аппарата ГИД -актуальное звено для обеспечения гибкости производства / В. Г. Будрик, **Е. Ю. Агаркова, И. Б. Васильева, А. И. Щипунов** // Переработка молока. – 2020. – № 5(247). – С. 26-27.

72. **Агаркова, Е. Ю.** Разработка и исследование аэрированного продукта на основе гидролизованных сывороточных концентратов / **Е. Ю. Агаркова** // Современные достижения биотехнологии. Техника, технологии и упаковка для реализации инновационных проектов на предприятиях пищевой и биотехнологической промышленности : Материалы VII Международной научно-практической конференции, Ставрополь-Пятигорск, 20–24 октября 2020 года / Под редакцией И.А. Евдокимова, А.Д. Лодыгина, А.А. Вартумяна. Том 1. – Ставрополь-Пятигорск: СКФУ, 2020. – С. 22-26.

73. **Агаркова, Е. Ю.** Направленный гидролиз белково-углеводного модуля молочной сыворотки / **Е. Ю. Агаркова** // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1, № 1(1). – С. 13-20. – DOI: <https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-13-20>.

74. **Агаркова, Е. Ю.** Гидролизированные белки молочной сыворотки с функциональным потенциалом / **Е. Ю. Агаркова** // Актуальные направления научных исследований: технологии, качество и безопасность : сборник материалов II Национальной (Всероссийской) конференции ученых в рамках III международного симпозиума «Инновации в пищевой биотехнологии», Кемерово, Россия, 17–19 мая 2021 года. – Кемерово: КемГУ, 2021. – С. 8-10.

75. Агаркова Е.Ю. Клинико-биологическая оценка кисломолочного продукта с гидролизатом сывороточных белков / Е. Ю. Агаркова //Международная неделя в Угличе: сборник материалов Международной научно-практической конференции. Молоко и молочная продукция: актуальные вопросы производства / ВНИИМС - филиал ФГБУН "ФНЦ пищевых систем В.М. Горбатова" РАН, 2021. – Углич, 2021. – С. 272-275.

76. Fedorova, T. V., Torkova, A. A., Agarkova, E. Y., Kruchinin, A. G., Smirnova, E. A., & Koroleva, O. V. (2016). Functional ingredients and food production in Russian Federation: state of art and future trends. In Superfoods for nutrition and well-being: international conference on nutraceuticals and functional foods (7-9 July (Vol. 2016, p. 9).

Результаты интеллектуальной деятельности

77. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022669040 Российская Федерация. Расчет физико-химических показателей и норм расхода сырья при производстве творога : № 2022667489 : заявл. 26.09.2022 : опубл. 14.10.2022 / В. Г. Блиадзе, В. К. Семипятный, А. В. Бигаева, А. Е. Рябова, Н. С. Пряничникова, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин ; заявитель ФГАНУ «ВНИМИ».

78. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022669428 Российская Федерация. Проектирование кисломолочного продукта с обогащающими компонентами : № 2022668656 : заявл. 11.10.2022 : опубл. 19.10.2022 / З. С. Зобкова, В. К. Семипятный, Е. Г. Лазарева, А. Г. Галстян, **Е. Ю. Агаркова**, А. Г. Кручинин ; заявитель ФГАНУ «ВНИМИ».

79. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022680921 Российская Федерация. Программа системного анализа и выбора оптимальных ферментных препаратов для высвобождения биоактивных препаратов : № 2022680193 : заявл. 28.10.2022 : опубл. 08.11.2022 / **Е. Ю. Агаркова**, В. К. Семипятный, Н. С. Пряничникова [и др.] ; заявитель ФГАНУ «ВНИМИ».

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- САК – содержание свободных аминокислот
- СГ – степень гидролиза
- КСБ – концентрат сывороточных белков
- АПФ – ангиотензин превращающий фермент
- АГА – антигипертензивная активность
- АОЕ – антиоксидантная емкость
- АМА – антимикробная активность
- АЛТ – аланиновая аминотрансфераза
- АСТ – аспарагиновая аминотрансфераза
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- МДА – малоновый диальдегид
- ТБК – тиобарбитуровая кислота
- PDB – Protein Data Bank
- АД – артериальное давление
- NC-IUBMB (Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology) – Международный союз биохимиков и молекулярных биологов
- ПААГ – полиакриламидный гель
- MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией
- ORAC (oxygen radical absorbance capacity) – способность поглощения радикалов кислорода
- GLYCAM1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1) – зависящая от гликозилирования молекула клеточной адгезии -1
- ТЭ – тролокс эквивалент
- ЛПНП – липиды низкой плотности
- ЛНВП – липиды высокой плотности
- УФ – ультрафильтрация
- SHR (spontaneously hypertensive rat) – крысы линии со спонтанной гипертензией
- IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования
- Alc – ферментный препарат Alcalase® 2.4 L FG (субтилизин)
- Prot – ферментный препарат Protamex® FG (субтилизин)
- Therm – ферментный препарат Thermolysin® FG
- A_E – частота встречаемости пептидов
- ГСБ – гидролизат сывороточных белков
- Фк – фактор концентрирования
- ФГК – фосфоглицераткиназа