На правах рукописи

Симоненко Елена Сергеевна

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ НА ОСНОВЕ КОБЫЛЬЕГО МОЛОКА

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

МОСКВА – 2022

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте детского питания – филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (НИИ детского питания – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

Научный руководитель: доктор технических наук, академик РАН **Петров Андрей Николаевич**

Официальные оппоненты: **Мельникова Елена Ивановна**
доктор технических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» Кафедра технологии продуктов животного происхождения, профессор

Раскошная Татьяна Александровна
кандидат технических наук, ООО "Хр. Хансен" Аналитическая лаборатория, начальник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет»

Защита состоится «11» августа 2022 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу 109316, Москва, Талалихина, 26.

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

Автореферат разослан « » _____ 2022 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат технических наук, старший научный
сотрудник А.Н. Захаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

В соответствии со Стратегией повышения качества пищевой продукции до 2030 года (Распоряжение Правительства РФ от 29 июня 2016 г № 1364-р) приоритетным направлением государственной политики в области здорового питания населения в Российской Федерации является разработка и производство продуктов функциональной направленности, с целью увеличения продолжительности и повышения качества жизни. Особый интерес представляют продукты на основе кобыльего молока, которое обладает ценными свойствами для жизнедеятельности человека, обусловленными его уникальным составом, отличающимся от других видов молока. Единственный доступный на рынке кисломолочный продукт на основе кобыльего молока, выпускаемый на промышленной основе, – кумыс, обладающий лечебными свойствами. Повышение функциональных свойств продуктов на основе кобыльего молока возможно за счет обогащения молочнокислыми и пробиотическими микроорганизмами, используемыми при производстве кисломолочных продуктов. Среди пробиотических культур большое внимание исследователей уделяется *Lactobacillus rhamnosus (Lacticaseibacillus rhamnosus),* которые обладают антимикробной активностью, антиоксидантными и гипотензивными свойствами, а также *Lactobacillus bulgaricus и Lactobacillus thermophilus* с доказанными гепатопротекторными и противовоспалительными эффектами.

В этой связи исследования, направленные на разработку технологии кисломолочных продуктов на основе кобыльего молока с использованием пробиотических и молочнокислых микроорганизмов, являются актуальными и перспективными, так как позволят расширить ассортимент молочных продуктов функциональной направленности.

Степень разработанности темы исследования. Исследованиям свойств кобыльего молока посвящены работы ряда отечественных ученых: Т.А. Антиповой, С.Г. Канарейкиной, И.А. Сайгина, Ю.А. Синявского, а вопросами использования пробиотических молочнокислых культур при производстве кисломолочных продуктов посвящены работы таких ученых, как А.В. Бегуновой, А.В. Гудковым, Н.Р. Ефимочкиной, И.В. Рожковой, В.Ф. Семенихиной, Г.М. Свириденко, С.А. Шевелевой и других.

Целью работы является научное обоснование и разработка технологии кисломолочных продуктов функциональной направленности на основе кобыльего молока.

Задачи исследования:

- выявить потребительские предпочтения и разработать медико-биологические требования (МБТ) к кисломолочным продуктам (КП) на основе кобыльего молока (КобМ);
- сформировать критерии идентификации КобМ на основе органолептических, физико-химических, биохимических показателей;
- изучить влияние режимов термической обработки КобМ, кобыльего молока с повышенным содержанием сухих веществ до 15% (ККобМ), кобыльего

молока с добавлением коровьего (КобМ/КорМ) на физико-химические, микробиологические и органолептические показатели и определить рациональный режим пастеризации;

- изучить процесс ферментации КобМ, ККобМ и КобМ/КорМ под действием подобранной бактериальной закваски, обладающей технологическими и пробиотическими свойствами;

- разработать технологию и нормативную документацию на КП на основе КобМ, определить сроки годности продукта, провести апробацию разработанной технологии;

- доказать функциональную направленность разработанных КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ методами *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна:

- разработана система идентификации КобМ, основанная на его органолептических, физико-химических, биохимических показателях;

- определено влияние режимов пастеризации на комплекс физико-химических, органолептических, микробиологических показателей КобМ, ККобМ и КобМ/КорМ;

- получены новые знания о закономерностях ферментирования под действием подобранной бактериальной закваски в ККобМ и КобМ/КорМ;

- доказаны функциональные свойства КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ методами *in vitro* и *in vivo*.

Практическая значимость:

- выявлены потребительские предпочтения в отношении КП на основе КобМ;

- разработаны МБТ на КП на основе КобМ;

- обоснован режим пастеризации и ферментации КобМ, ККобМ и КобМ/КорМ;

- обоснована комбинация бактериальной закваски, состоящая из комбинации молочнокислых (*Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) и пробиотических *(Lactobacillus rhamnosus* F*)* микроорганизмов;

- разработана технология производства КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ, нормативная документация ТУ 10.51.52-162-00419006-2021;

- осуществлена опытно-промышленная апробация разработанной технологии на ООО «Мясокомбинат «Дороничи», Волковысское ОАО «Беллакт», ГКУ Республики Башкортостан «Управление социального питания».

Методология и методы исследования. Использованы общепринятые, стандартизованные и исследовательские методы.

Положения, выносимые на защиту:

- система идентификации КобМ, построенная на органолептических, физико-химических и биохимических критериях;

- технологические режимы производства КП на основе ККобМ КобМ/КорМ;

- подтверждение функциональных свойств КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ методами *in vitro* и *in vivo.*

Степень достоверности и апробация работы. Полученные результаты исследований подтверждены математической обработкой экспериментальных данных с использованием компьютерного пакета «Statistica 10.0». Исследования проводились на базе НИИ детского питания – филиала ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Результаты исследований подтверждены опытно-промышленной апробацией разработанной технологии.

Основные положения и результаты работы представлены и доложены на научных конференциях, форумах, конгрессах: III Бизнес-Форум «Развитие производства обогащенной и специализированной пищевой продукции. Новый формат взаимодействия индустрии и медицины» (Москва, 2021), XII Молочная олимпиада (Новороссийск, 2021), XV Всероссийская научно-практическая конференция «Доверие потребителей к Российской молочной продукции через обеспечение единства и открытости отрасли» (Адлер, 2019), XXVII Международная конференция «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, 2019), XVII Всероссийский конгресс диетологов и нутрициологов «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Профилактическое, лечебное и спортивное питание» (Москва, 2018).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, из них 10 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи в журналах, индексируемых в Scopus, 1 патент.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, экспериментальной части, основных результатов и выводов, списка использованной литературы, содержащего 182 отечественных и зарубежных источников. Работа изложена на 142 страницах, включает 20 таблиц, 36 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также приведены данные по структуре и объему диссертационной работы.

В первой главе представлен анализ отечественной и зарубежной научно-технической литературы по состоянию развития производства продуктов на основе КобМ, КП, составу и функциональным свойствам КобМ, различным видам молочнокислых и пробиотических микроорганизмов, применяемых в КП.

Во второй главе «Организация работы, объекты и методы исследования» описаны объекты и методы исследования, представлена схема проведения исследований (рисунок 1).

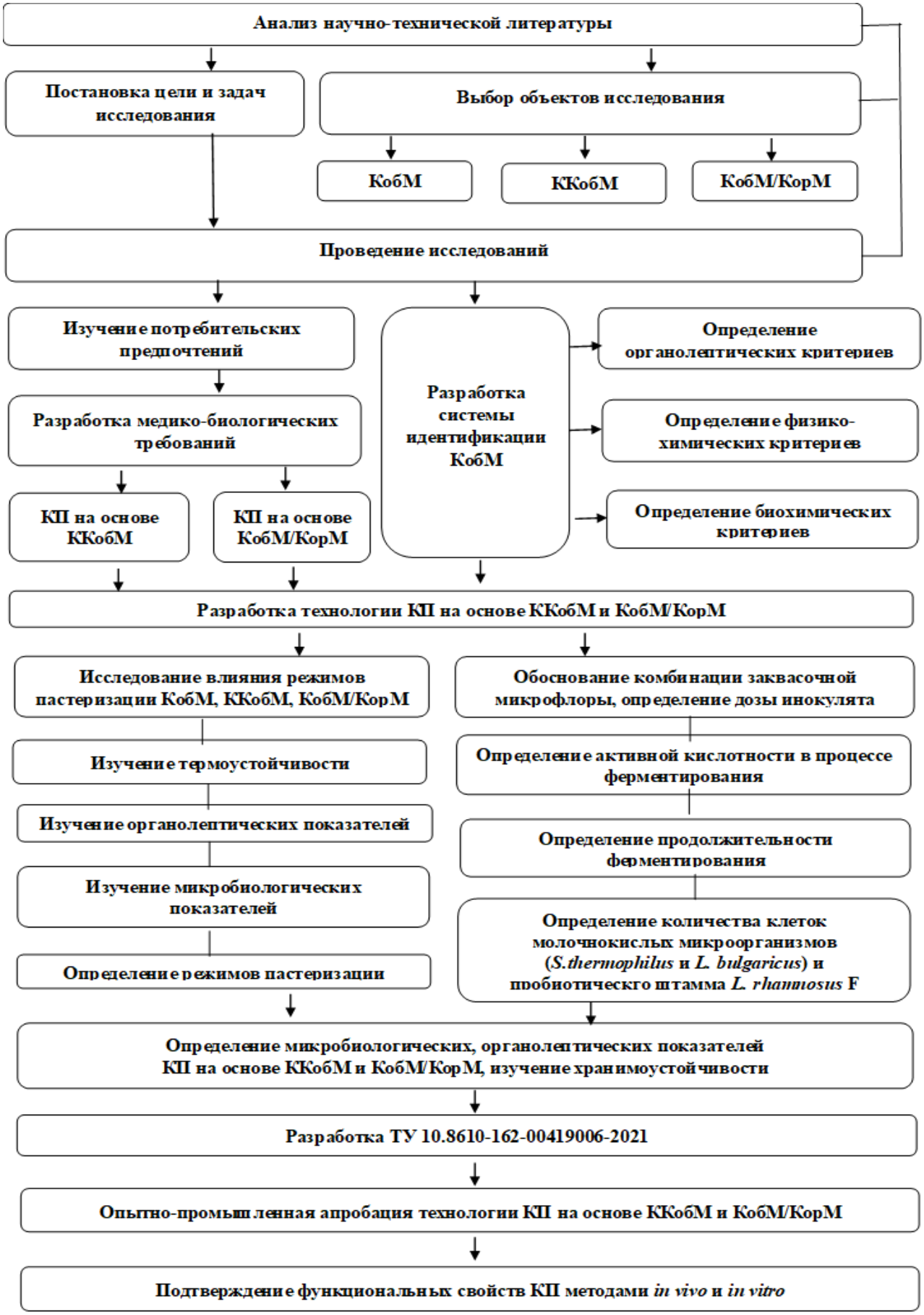


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Определены объекты исследования: КобМ сырое по ГОСТ Р 52973-2008, ККобМ (КобМ сырое с добавлением КобМ сухого по ГОСТ Р 52975-2008), КобМ сырое с добавлением КорМ сырого по ГОСТ 31449-2013, КП на основе ККобМ, КП на основе КобМ/КорМ. При выполнении работы использованы физико-химические методы определения термоустойчивости по алкогольной (ГОСТ 25228-82) и тепловой пробам, микроскопирование, оценка органолептических показателей, а также микробиологические методы определения молочнокислых и пробиотических микроорганизмов. Состав сывороточных белков кобыльего и коровьего молока анализировали методом ВЭЖХ на колонке Machinery Nagel C18 4,6 × 250, 5 мкм (США). Разделение проводили в ВЭЖХ-системе (Agilent 1100, Agilent Technologies) в потоке 1,0 мл/мин; поглощение элюата измеряли при длинах волн 214 и 280 нм. Определение активной кислотности проводили в соответствии с ГОСТ 32892-14. Активность кислотообразования определяли с использованием прибора параллельных биореакторов фирмы DAS GIP (Германия). Количество клеток молочнокислых микроорганизмов определяли по ГОСТ 33 951-16. Рекомендуемые сроки годности устанавливали в соответствии с МУК 4.2.1847-04. Антимикробную активность определяли по МУК 4.2.1890-04 диско-диффузным методом. Антиоксидантный потенциал КП определяли методами DPPH (the DPPH radical scavenging activity, RSA %) и FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) с использованием спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия). Исследование функциональных свойств КП *in vivo* выполняли на 40 мышах самках C57BL/6J возрастом 5–6 недель и исходной массой тела (15,2±0,9) г на начало эксперимента. Эксперимент продолжался в течение 24 суток. Животные были распределены на 5 групп. В целях моделирования неалкогольного стеатоза печени и гиперлипидемии мыши групп 1, 2, 3 и 4 получали рацион с повышенным содержанием насыщенных жиров («Western Diet», WD) – аналог D12079Bi ResearchDiets (США). Животные группы 5 получали полнорационный комбикорм по ТУ 9296-002-70941247. Содержание, питание, уход за животными, манипуляции осуществляли в соответствии с ГОСТ 33215, ГОСТ 33216, Директивой 1000.63 EU Европейского парламента и совета Европейского союза.

В третьей главе «Оценка потребительских предпочтений и разработка медико-биологических требований на кисломолочные продукты» представлены результаты исследований потребительских предпочтений к КобМ и разработки МБТ на КП.

В рамках социологического исследования, проведенного по методике опроса, выделены две целевые группы (рисунок 2):

I группа – население, традиционно потребляющее КобМ;

II группа – население, для которого КобМ не является традиционным продуктом потребления.

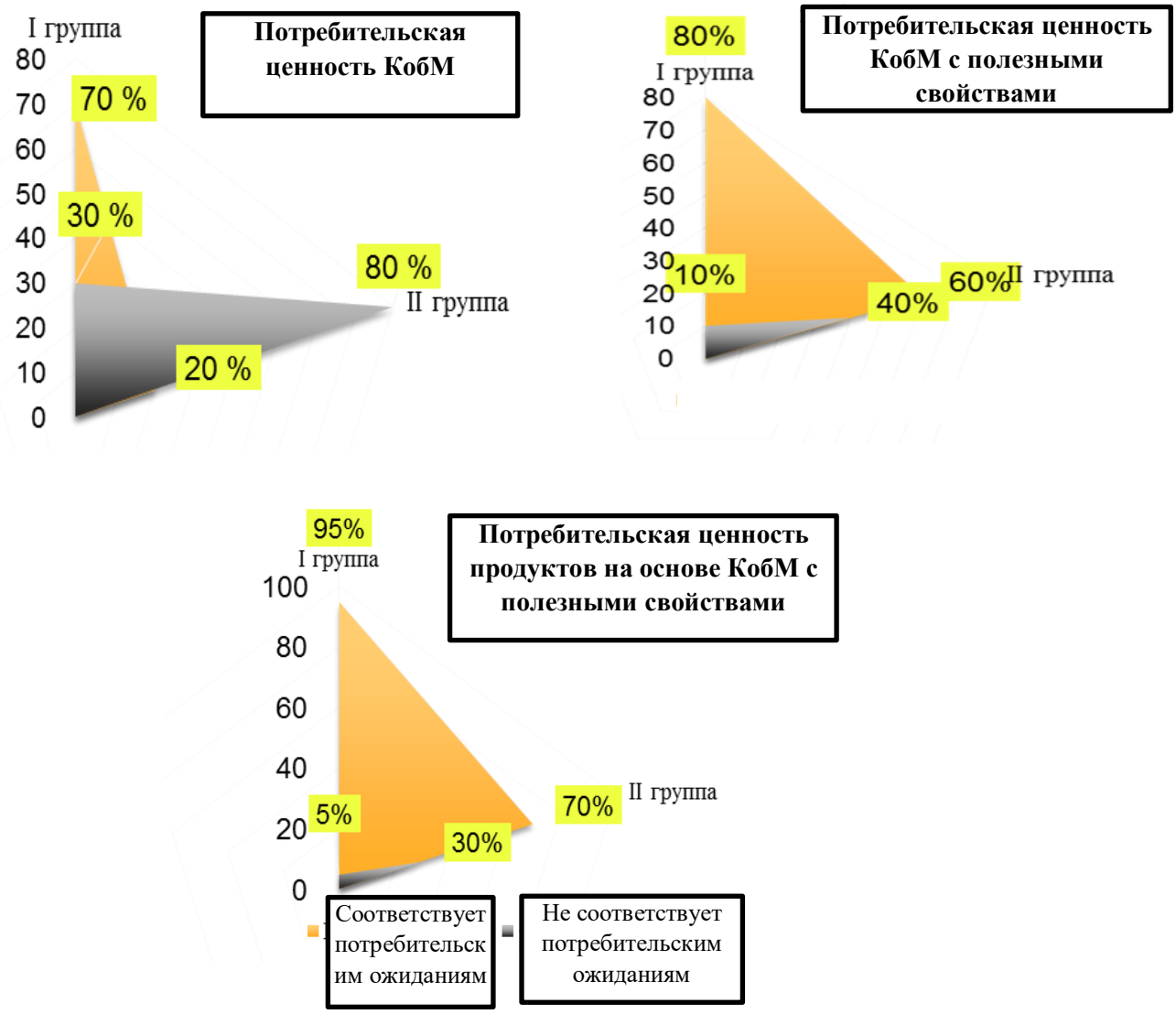


Рисунок 2 – Результаты социологического опроса

Анализ, результатов опроса потенциальных потребителей (рисунок 2) установил, что для I группы потребительская ценность КобМ соответствует ожиданиям потребителей, которые испытывали позитивное отношение от его использования. Для II группы сдерживающим фактором, определяющим потребительскую ценность и ожидание от продукта, являлся специфический вкус КобМ, потреблять которое они готовы при наличии полезных свойств. Результаты опроса всех респондентов показали, что 55% не устраивал вкус, при этом больше половины респондентов положительно отнеслись к полезным свойствам КобМ. Опрос более 70% респондентов установил предпочтительное отношение к КП на основе КобМ с полезными свойствами и положительно влияющими на здоровье, что подтверждает актуальность поставленной в работе цели.

По результатам опроса сформирован методический подход к разработке двух продуктов функциональной направленности: первый – с выраженным специфическим вкусом КобМ для населения с традиционным потреблением, второй – с невыраженным вкусом КобМ.

На основании современных тенденций нутрициологии разработаны МБТ в отношении КП, включающие показатели пищевой ценности и безопасности.

Функциональная направленность продуктов формируется за счет уникальных свойств КобМ (состава) в комбинации с пробиотическими и молочнокислыми микроорганизмами, что в совокупности позволяет обеспечить антимикробные, антиоксидантные, гепатопротекторные свойства и низкий индекс атерогенности продуктов.

В четвертой главе «Разработка системы идентификации кобыльего молока» определены органолептические, физико-химические и биохимические показатели идентификации КобМ. Исходя из того, что КобМ – уникальный продукт с высокой потребительской стоимостью, система идентификации направлена на повышение качества и контроля продукции на основе КобМ. Достоверная идентификация станет барьером для фальсификации КобМ более доступным КорМ.

Система **идентификации** построена на выявлении, определении и объединении значимых индивидуальных признаков, присущих КобМ, с учетом апробированных органолептических, физико-химических, биохимических и аналитических методов анализа в единый алгоритм.

Органолептические критерии идентификации. Введен ряд дополнительных терминов, определяющих особенности вкуса КобМ: сильно выраженный специфический вкус, умеренно выраженный специфический вкус, слабовыраженный специфический вкус, невыраженный специфический вкус.

Проведенная сравнительная органолептическая оценка цвета и запаха КобМ и КорМ не выявила значимых идентификационных различий. Особенность органолептической оценки КобМ проявляется в специфическом вкусе: сладковатом, вяжущем, не свойственном КорМ. Проведена оценка органолептических показателей КобМ и КобМ в сочетании с КорМ в соотношениях 75/25, 60/40 (таблица 1). Выполнены исследования влияния на вкусовые показатели КобМ (1,5% массовая доля жира) добавления КорМ с массовой долей жира от 1,5% до 5,5%.

Таблица 1 – Результаты органолептической оценки КобМ и КобМ/КорМ

Соотношение КобМ/КорМ, %	**Массовая доля жира в КорМ, %**	**Восприятие вкуса КобМ**			
		Сильно выраженный	**Умеренно выраженный**	**Слабо выраженный**	**Невыраженный**
100/0	1,5	+	–	–	–
75/25	1,5	+	–	–	–
	2,5	+	–	–	–
	3,5	–	+	–	–
	4,5	–	+	–	–
	5,5	–	–	+	–
60/40	1,5	–	+	–	–
	2,5	–	+	+	–
	3,5	–	–	+	+
	4,5	–	–	–	+
	5,5	–	–	–	+

Из результатов органолептической оценки следует, что вкус, свойственный КобМ, сохраняется при соотношении 75/25 КобМ/КорМ и массовой доли жира

коровьего молока ≤1,5%. С увеличением содержания жира в КорМ вкус КобМ ослабевает. Получить продукт с невыраженным вкусом КобМ допустимо при соотношениях КобМ/КорМ (жирностью КорМ ≥3%) 60/40.

Физико-химические критерии идентификации. На основе проведенных исследований и анализа литературных данных по химическому составу КобМ и КорМ сформирована база данных по физико-химическим показателям КобМ, определённым в качестве идентификационных, в сравнении с КорМ (таблица 2). При выборе физико-химических показателей учтена практика применения современных, валидированных методов.

Таблица 2 – Идентификационные физико-химические показатели КобМ

Идентификационный показатель	**Диапазон варьирования значения показателя**		**Метод контроля**
	КобМ	**КорМ**	
Лактоза, %	6,5–7,1	4,6–4,9	ГОСТ Р 54667-2011 ГОСТ 29248-91
Жир, %	1,5–1,7	3,2–5,0	ГОСТ 5867-90
Лизоцим, мг/100 г	80,1–85,0	10,0–13,0	ISO 27105:2016
Содержание общего белка, %	1,7–2,4	2,8–3,6	ГОСТ 23327-98 ГОСТ 34454-2018
Содержание казеина от общего белка, %	40,2–48,4	75,1–85,0	ГОСТ 34536-2019
Содержание сывороточных белков от общего белка, %	38,8–51,6	17,5–21,4	
Содержание β-лактоглобулина от сывороточных белков, %	25,3–36,3	52,9–53,6	
Содержание α-лактоальбумина от сывороточных белков, %	27,5–29,7	18,4–20,1	
Альбумины от сывороточных белков, %	4,4–4,5	5,5–7,6	
Иммуноглобулины от сывороточных белков, %	18,7–20,9	10,1–11,7	
Лактоферрин от сывороточных белков, %	9,9–10,0	8,0–8,4	ГОСТ 33600-2015
Жирнокислотный состав, %			ГОСТ 32915-2014
ПНЖК Линолевая кислота Линоленовая кислота ω-6 (линолевая, γ-линоленовая, арахидоновая) ω-3 (α-линоленовая, эйкозапентаеновая, докозагексаеновая) НЖК Масляная кислота Пальмитиновая кислота Миристиновая кислота Стеариновая кислота	23,3–29,3 10,0–15,9 8,2–11,0 15,6–17,5 7,6–9,0 46,0–51,3 0,01 16,6–20,0 5,3–6,0 0,6–0,8	2,4–4,0 2,0–3,5 0,3–1,5 2,2–2,3 0,1–0,2 73,4–78,4 3,0–4,0 27,0–33,0 10,0–12,0 9,1–13,0	

По содержанию жира КобМ значительно (в среднем в 2 раза) уступает КорМ, но при этом общее содержание ПНЖК (из них линолевая кислота в среднем 2 раза и линоленовая в 10 раз) превышает показатели КорМ в 10 раз. Содержание ω-6 жирных кислот превышает их уровень у КорМ в 7 раз, уровень ω-3 жирных кислот превышает аналогичные показатели в КорМ 42 раза. Общее содержание НЖК КобМ в 1,6 раза меньше данного показателя КорМ, показатель масляной кислоты в 300 раз меньше такового КорМ.

Содержание лактозы в КобМ в 1,5 раза выше, чем в КорМ. Значимое различие, с точки зрения идентификации, в составе белков КобМ в сравнении с КорМ составляют сывороточные белки до 51,6% от общего содержания белка в КобМ, на долю сывороточных белков в КорМ приходится до 21,43%.

Значимым физико-химическими критерием идентификации КобМ является содержание сывороточных белков, в связи с чем был проанализирован и исследован их фракционный состав.

Биохимические критерии идентификации. Использование метода ВЭЖХ позволило определить видовую принадлежность белков, входящих в состав КобМ. Усовершенствование методики измерений белкового профиля с применением метода ВЭЖХ позволило определить содержание сывороточных белков КобМ и его комбинации с КорМ. Проведены исследования комбинации КобМ и КорМ в различных соотношениях.

На рисунке 3 представлены результаты ВЭЖХ анализа сывороточных белков КобМ, КорМ и их комбинаций в соотношениях 60/40, 75/25.

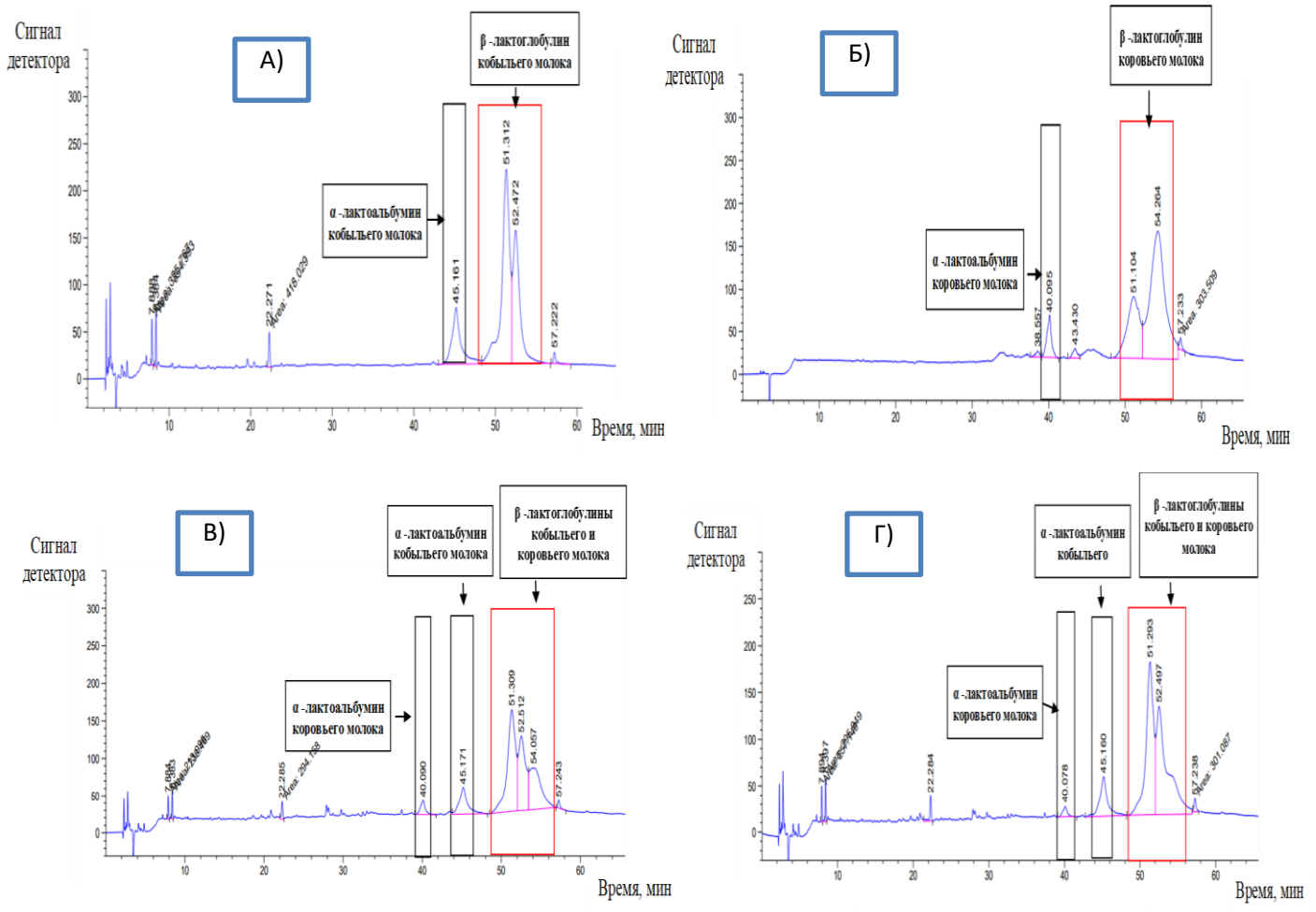


Рисунок 3 – Хроматограмма сывороточных белков:
А – КобМ; Б – КорМ; В – КобМ/КорМ 60/40; Г – КобМ/КорМ 75/25

Анализ данных, представленных на рисунке 3, показывает, что время удерживания β-лактоглобулинов (β-лг) КобМ и КорМ совпадает, в связи с этим их использование в качестве белка-маркеров невозможно.

Исходя из полученных хроматограмм, время удерживания α-лактоальбуминов (α-ла) КобМ и КорМ при различных соотношениях комбинации неизменны и при этом существенно различались (40 мин для КорМ, 45 мин для КобМ). Эти значимые различия, вероятно, связаны с результатами проведенных рядом исследователей, в которых установлено наличие 33 замен аминокислот первичной структуры α-ла КобМ и КорМ, что, в свою очередь, приводит к изменению вторичной структуры и, как следствие, различному сродству к гидрофобному сорбенту колонки С18. Данные различия позволили использовать α-ла в качестве белка-маркера видовой принадлежности КобМ в комбинации с КорМ.

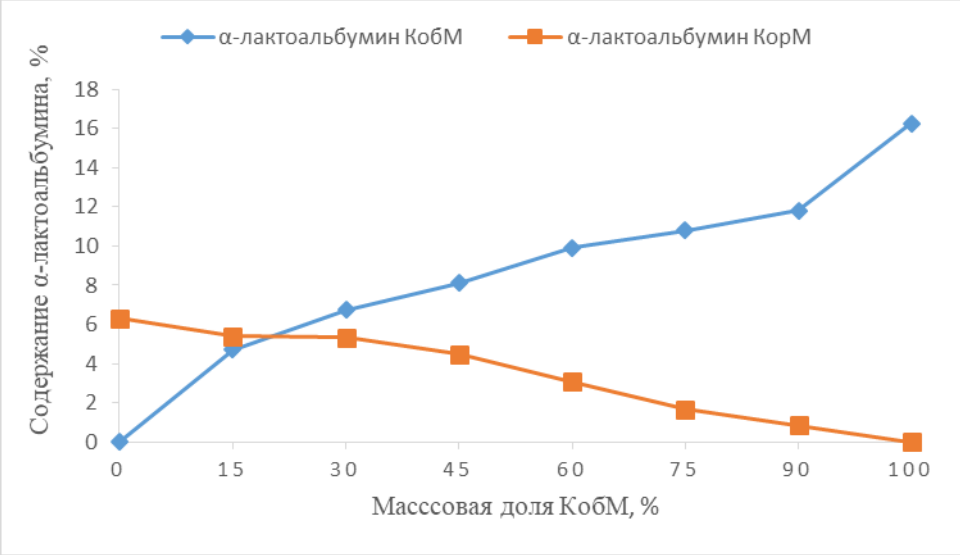


Рисунок 4 – Содержание α-ла в КобМ и в комбинации с КорМ

На основании полученных данных построен график (рисунок 4), позволивший определить доли α-ла и в дальнейшем рассчитать содержание КобМ и КорМ.

По результатам проведенных исследований подтверждена эффективность применения метода ВЭЖХ для идентификации КобМ. Выявленные в результате исследований параметры разделения сывороточных белков методом ВЭЖХ позволили в течение 60 мин получить хроматограмму фракций сывороточных белков КобМ. Количественная оценка содержания α-ла достоверно определяет наличие в КобМ не менее 7% добавленного КорМ.

На основе сочетания органолептических, физико-химических и биохимических показателей создана система, позволяющая идентифицировать КобМ и определять его долю в комбинации с КорМ.

В пятой главе «Исследования режимов термической обработки кобыльего молока» приведены результаты исследований влияния режимов пастеризации на физико-химические, микробиологические и органолептические показатели КобМ, ККобМ, КобМ/КорМ.

Одним из основных сдерживающих факторов использования КобМ в молочной промышленности является его низкая термоустойчивость и проявление постороннего вкуса. Для решения этой проблемы были изучены режимы термической обработки КобМ, ККобМ и КобМ/КорМ. По алкогольной пробе все

образцы показали неудовлетворительные результаты (таблица 3). Параллельно проведены исследования термоустойчивости методом тепловой пробы. Температурные режимы 68°С и выше резко сокращают продолжительность выдержки до наступления видимой коагуляции белка.

Результаты микроскопирования позволили определить, что в исследуемых образцах образование коагуляционных частиц проявляется за 50–80 с до начала видимой коагуляции, что было учтено при разработке режима пастеризации. В процессе исследований термоустойчивости КобМ, ККобМ, КобМ/КорМ проведена органолептическая оценка. Температуры выше 72°С и увеличение продолжительности выдержки более 480 с приводило к появлению прогрессирующей горечи и появлению неоднородности молока в виде белковых мелких хлопьев. Этот фактор в значительной степени ограничивает использование для производства КП общепринятых режимов пастеризации КобМ.

Таблица 3 – Термоустойчивость КобМ, ККобМ, КобМ/КорМ

Показатель	**Единица измерения**	**КобМ**	**ККобМ**	**КобМ/КорМ 60/40**
Титруемая кислотность	°Т	6,5±0,5	12±0,5	19±0,5
Активная кислотность	pH	6,8±0,02	6,7±0,02	6,6±0,02
Алкогольная проба	Группа	≤5	≤5	≤5
	Объемная доля этилового спирта, %	68	68	68
Тепловая проба	Температурный режим, °С	Продолжительность выдержки до наступления видимой коагуляции белка, с		
	65±1	5400±15	4200±15	7200±20
	68±1	1500±15	900±15	2100±20
	72±1	840±10	480±10	1500±15
	75±1	720±10	360±10	1080±15
	78±1	240±10	120±10	480±10
	82±1	120±10	*	240±10

Примечание: * – коагуляция наступила до достижения заданной температуры.

В дальнейших исследованиях была изучена эффективность режимов пастеризации и их влияние на органолептические и микробиологические показатели с целью определения рациональных температурно-временных условий пастеризации, обеспечивающих сохранение как органолептических свойств, так и показателей микробиологической безопасности.

Из таблицы 4 следует, что наилучшие органолептические показатели отмечены во всех образцах при температуре пастеризации (65±1)°С с выдержкой 1800 с (30 мин). Наибольшие негативные изменения в органолептических показателях выявлены при температуре пастеризации выше (68±1)°С и продолжительности выдержки более 1200 с (20 мин). В КобМ проявился привкус горечи и отмечены единичные хлопья белка. Аналогичные изменения зафиксированы в ККобМ и КобМ/КорМ.

Анализ влияния температурно-временных режимов пастеризации на микробиологические показатели бактерий группы кишечных палочек установил, что все результаты не превышали нормируемые показатели.

Таблица 4 – Органолептические показатели КобМ, ККобМ, КобМ/КорМ в зависимости от режима пастеризации

КобМ	**ККобМ**	**КобМ/КорМ 60/40**
Режим пастеризации 65 °С, выдержка 1800 с (30 мин)		
Вкус – умеренно выраженный, без посторонних привкусов Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная	Вкус – умеренно выраженный, без посторонних привкусов Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная	Вкус – невыраженный Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная
Режим пастеризации 68 °С, выдержка 1200 с (20 мин)		
Вкус – умеренно выраженный, без посторонних привкусов Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная, единичные хлопья белка	Вкус умеренно выраженный, без посторонних привкусов Цвет – молочно-белый Консистенция – неоднородная, единичные хлопья белка	Вкус – слабо выраженный Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная, единичные хлопья белка
Режим пастеризации 72 °С, выдержка 600 с (10 мин)		
Вкус умеренно выраженный, без посторонних привкусов Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная, единичные хлопья белка	Вкус умеренно выраженный, с легким, горьким привкусом Цвет – молочно-белый Консистенция – неоднородная, единичные хлопья белка	Вкус – умеренно выраженный Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная, единичные хлопья белка
Режим пастеризации 75 °С, выдержка 300 с (5 мин)		
Вкус – умеренно выраженный, со слабым горьким привкусом Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная, единичные хлопья белка	Вкус сильно выраженный с горьким привкусом Цвет – молочно-белый Консистенция – неоднородная, осадок, хлопья белка	Вкус – сильно выраженный Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная, единичные хлопья белка
Режим пастеризации 78 °С, выдержка 120 с (2 мин)		
Вкус – сильно выраженный Цвет – молочно-белый Консистенция – неоднородная, осадок, хлопья белка	Вкус – сильно выраженный с явным горьким привкусом Цвет – молочно-белый Консистенция – неоднородная, осадок, хлопья белка	Вкус – сильно выраженный с горьким привкусом Цвет – молочно-белый Консистенция – однородная, единичные хлопья белка

При производстве КП к молоку предъявляют повышенные микробиологические требования и, как правило, применяют высокотемпературные режимы пастеризации. В связи с этим проведены исследования по влиянию двухступенчатой пастеризации, включающей режим предварительной термизации молока. Органолептические показатели режима двухступенчатой пастеризации, включающей в себя термизацию при (58±1)°С/1200 с, охлаждение до 6±2°С, выдержку 4 ч, и последующую пастеризацию (72±1)°С/15 с: вкус ККобМ – умеренно выраженный, вкус КобМ/КорМ – невыраженный, цвет – молочно-белый, консистенция – однородная.

Низкотемпературная (65±1)°С пастеризация с длительной выдержкой не технологична и в настоящее время в производстве практически не применяется. Альтернативой является применение двухступенчатой пастеризации КобМ, включающей термизацию при (58±1)°С с выдержкой 1200 с (20 мин) с последующим охлаждением до 6±2 °С в течение 4 ч, затем пастеризацией при (72±1)°С с выдержкой 15 с. Эксперименты подтвердили, что двухступенчатая

пастеризация позволяет достичь эффективности и при этом сохранить органолептические свойства.

В шестой главе «Исследование ферментативных процессов в кобыльем молоке под действием подобранной микрофлоры закваски» приведены исследования по разработке двух КП в соответствии с выявленными потребительскими предпочтениями и разработанными МБТ. Общее содержание белка в КобМ в 1,5 раза меньше чем в КорМ, при этом основная доля приходится на сывороточные белки. При сквашивании КобМ не образует плотного сгустка, в связи с чем сухие вещества КобМ были увеличены до 15% за счет внесения сухого КобМ.

При подборе комбинации бактериальных заквасок изучен процесс ферментации КобМ, ККобМ и КобМ/КорМ молочнокислыми бактериями *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и пробиотическим штаммом *Lactobacillus rhamnosus* F изменение активной кислотности, продолжительность сквашивания.

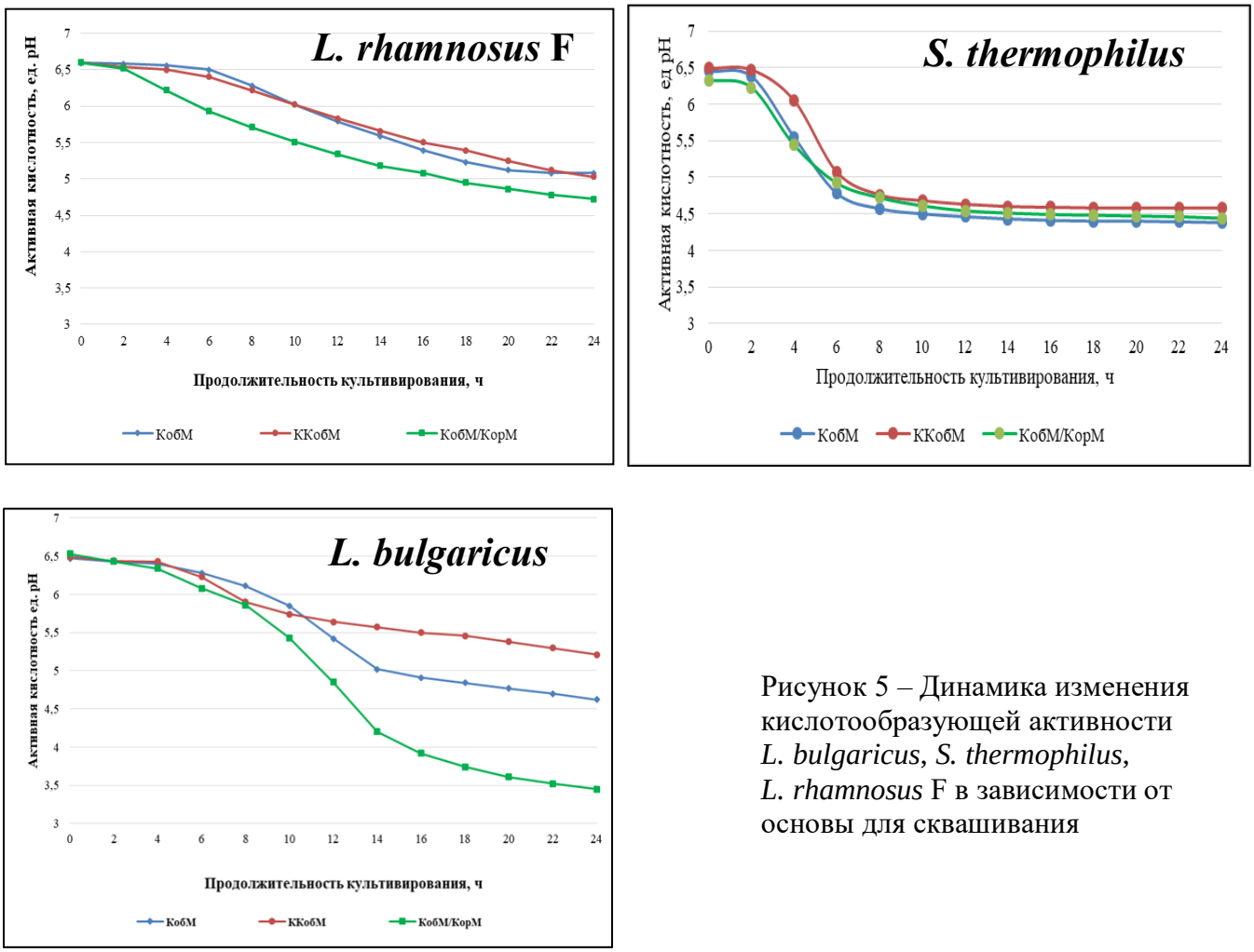


Рисунок 5 – Динамика изменения кислотообразующей активности *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. rhamnosus* F в зависимости от основы для сквашивания

В процессе исследования (рисунок 5) установлено, что пробиотический штамм *L. rhamnosus* F обладает слабой кислотообразующей активностью для обеспечения процесса ферментации при производстве КП, целесообразно его использовать в сочетании с другими заквасочными культурами. Кислотообразующая активность культур *S. thermophilus* и *L. bulgaricus*

изменялась в зависимости от основы для сквашивания. Так, через 12 ч культивирования КобМ/КорМ значение pH составило 4,67±0,02, а в случае сквашивания КобМ активная кислотность достигала значения (4,55±0,01) ед. pH только через 24 ч. Таким образом, при сквашивании КобМ/КорМ активность кислотообразования была выше в два раза.

На основании полученных данных по кислотообразующей активности для дальнейших исследований использовали комбинированную бактериальную закваску. В качестве основной кислотообразующей культуры применяли готовую производственную закваску, традиционно используемую в производстве йогуртов, *S. thermophilus* и *L. bulgaricus*, которая составила 1 часть от закваски, и пробиотический штамм *L. rhamnosus* F – 2, 4 и 6 частей от закваски. Количество вносимой закваски составило 5% и 7%. Культивирование культур проводили на молочной среде при (37±1)°С.

Результаты исследований по динамике изменения активной кислотности в процессе сквашивания различных основ при варьировании дозы закваски и соотношении культур в ней представлены на рисунке 6.

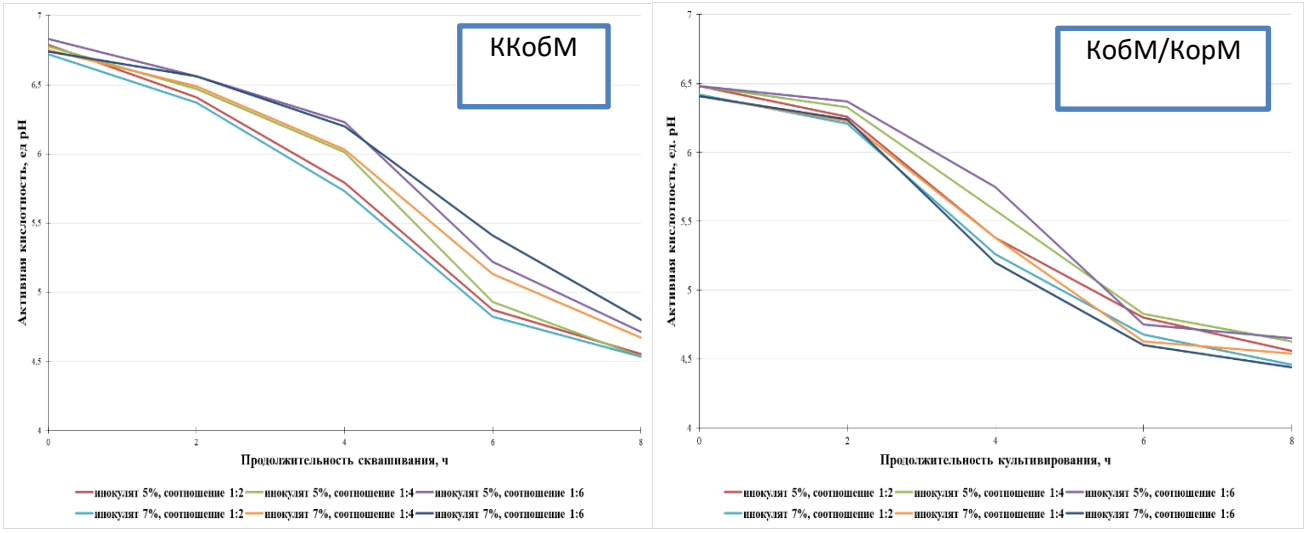
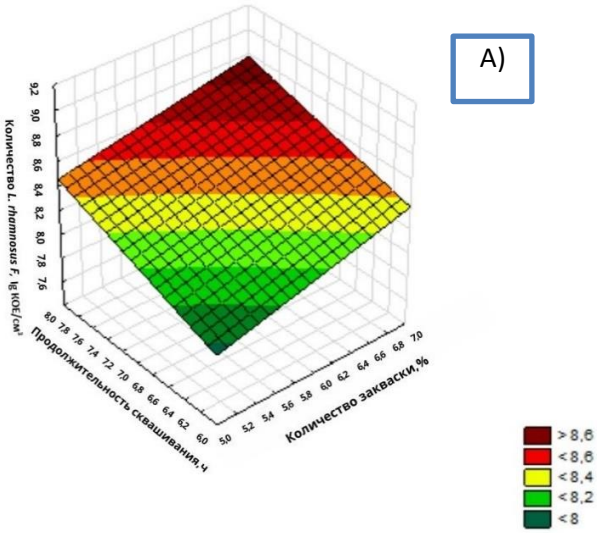


Рисунок 6 – Влияние количества закваски и соотношения штаммов в ней на изменение активной кислотности при сквашивании ККобМ и КобМ/КорМ

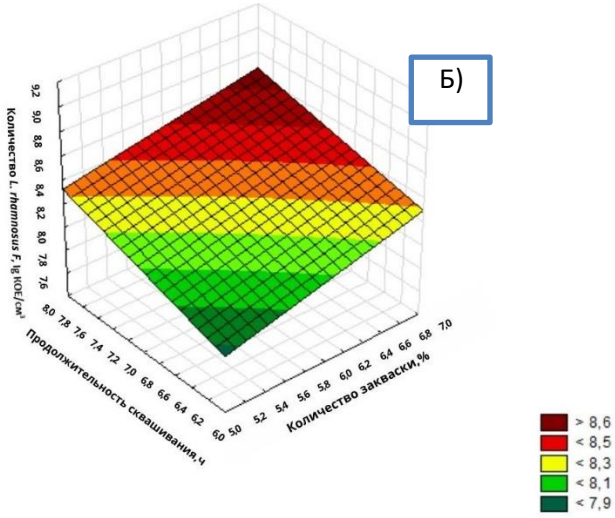
Согласно представленным данным (рисунок 5), при внесении 5% и 7% закваски с соотношением культур 1:2 и 1:4, через 8 ч сквашивания ККобМ активная кислотность (pH) находилась в диапазоне 4,53–4,67 ед. pH. Однако при внесении того же количества закваски в соотношении 1:6, через 8 ч активная кислотность составляла 4,71–4,98 ед. pH. При сквашивании КобМ/КорМ во всех образцах через 6 ч сквашивания значение pH варьировало в диапазоне 4,6–4,83, а через 8 ч составляло 4,44–4,65 ед. pH. Таким образом, добавление КорМ увеличивало активность кислотообразования, продолжительность сквашивания сократилась на 1,5 ч.

В процессе сквашивания определяли количество жизнеспособных клеток *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* и пробиотического штамма *L. rhamnosus* F в зависимости от продолжительности сквашивания, которое не должно превышать

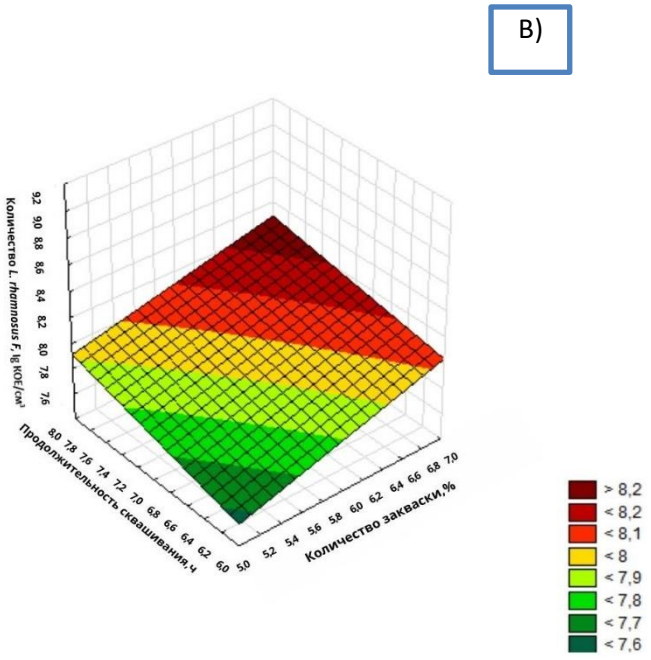
8 ч, соотношения закваски и основы для сквашивания. Данные по изменению количества клеток *L. rhamnosus* F в процессе сквашивания представлены на рисунках 7 и 8.



z = 4,85 + 0,33 x + 0,35 y – 0,02 x y



z = 4,83 + 0,33 x + 0,33 y – 0,02 x y



z = 4,75 + 0,35 x + 0,27 y – 0,02 x y

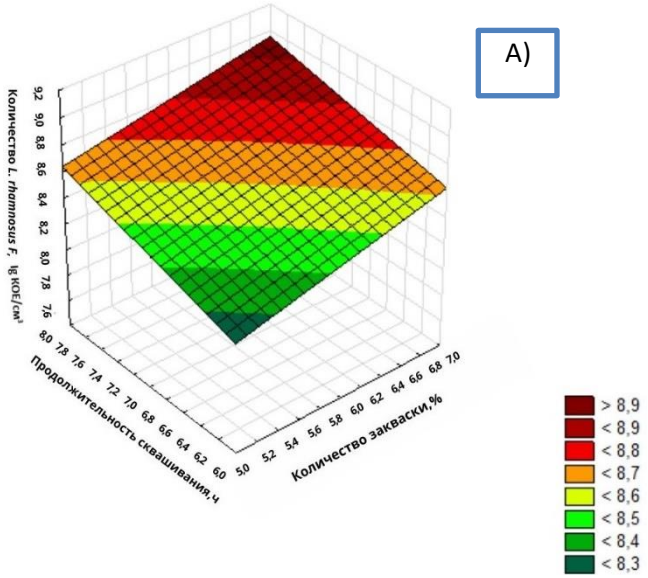
Рисунок 7 – Динамика продолжительности сквашивания в зависимости от количества пробиотического штамма *L. rhamnosus* F при сквашивании основы на ККобМ при различном соотношении культур в бактериальной закваске:

А – 1 часть закваски *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* и 6 частей *L. rhamnosus* F (1:6);

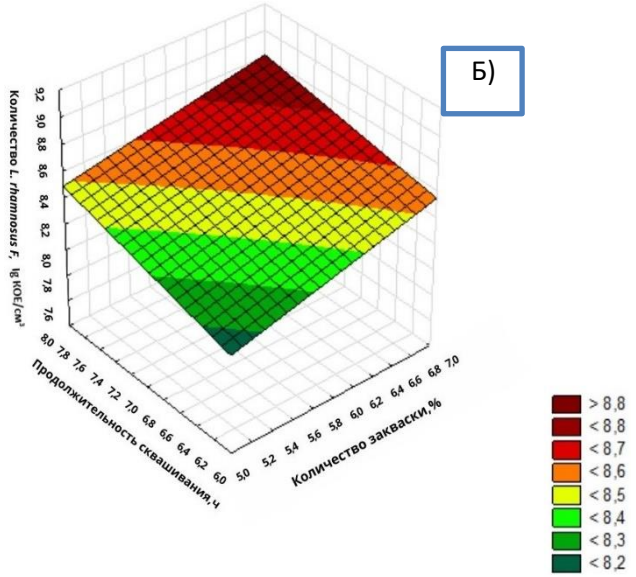
Б – 1 часть закваски *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* и 4 части *L. rhamnosus* F (1:4);

В – 1 часть закваски *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* и 2 части *L. rhamnosus* F (1:2)

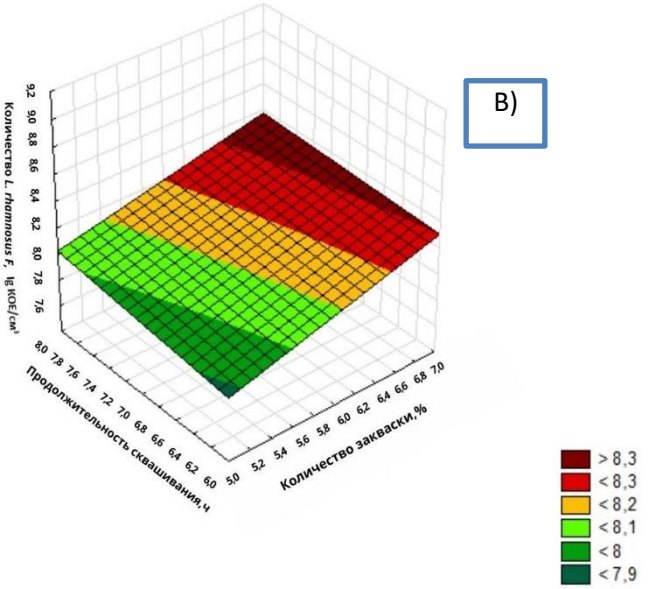
В соответствии с рисунками 7 и 8 при различном соотношении культур и увеличении дозы инокулята с 5% до 7% количество клеток *L. rhamnosus* F в процессе сквашивания основ на ККобМ и КобМ/КорМ увеличивалось на 30%. Анализ полученных данных по накоплению клеток *L. rhamnosus* F в процессе сквашивания ККобМ и КобМ/КорМ показал, что статистически значимых ($p \leq 0,05$) различий между выборками не было. При внесении 7% закваски с соотношением культур 1:6 через 8 ч сквашивания количество клеток *L. rhamnosus* F составило 7×10^8 КОЕ/см^3 при сквашивании основы на ККобМ и $9,5 \times 10^8$ КОЕ/см^3 при сквашивании основы на КобМ/КорМ.



z = 5,47+0,31x+0,29 y-0,02 x y



z = 5,55 + 0,31 x + 0,26 y - 0,02 x y



z = 5,82 + 0,32 x + 0,16 y – 0,02 x y

Рисунок 8 – Динамика продолжительности сквашивания в зависимости от количества пробиотического штамма *L. rhamnosus* F при сквашивании основы на КобМ/КорМ при различном соотношении культур в бактериальной закваске:

А – 1 часть закваски *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* и 6 частей *L. rhamnosus* F (1:6);

Б – 1 часть закваски *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* и 4 части *L. rhamnosus* F (1:4);

В – 1 часть закваски *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* и 2 части *L. rhamnosus* F (1:2)

На основании проведенных исследований для производства КП были установлены следующие технологические параметры:

- для ККобМ доза инокулята 7%, соотношение культур в закваске 1:4, продолжительность сквашивания 8 ч;
- для ККобМ/КорМ доза инокулята 7%, соотношение культур в закваске 1:6, продолжительность сквашивания 6,5 ч.

Исследования хранимоустойчивости и установления сроков годности для двух КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ.

Исходя из проведенных исследований количество клеток *L. rhamnosus* F снижается ниже допустимых для пробиотических продуктов значений только через 36 суток хранения и составляет $6{,}7\times10^5$ КОЕ/см^3.

Результаты исследований молочнокислых бактерий (*S. thermophilus* и *L. bulgaricus)* в процессе хранения КП составляло 5×10^6 КОЕ/см^3 к 36 суткам хранения. Микробиологические показатели КП (количество БГКП, патогенные микроорганизмы, в том числе *Salmonella* и *S. aureus*, а также дрожжи и плесневые

грибы) соответствовали требованиям ТР ТС 033/2013. Исходя из полученных результатов, рекомендуемый срок годности для КП составляет 30 суток.

В седьмой главе «Разработка технологии кисломолочных продуктов на основе кобыльего молока» технологический процесс производства КП представлен на рисунке 9 и состоит из общепринятых операций, включающих в себя разработанные в данной работе режимы пастеризации и ферментации продуктов на основе ККобМ и КобМ/КорМ.

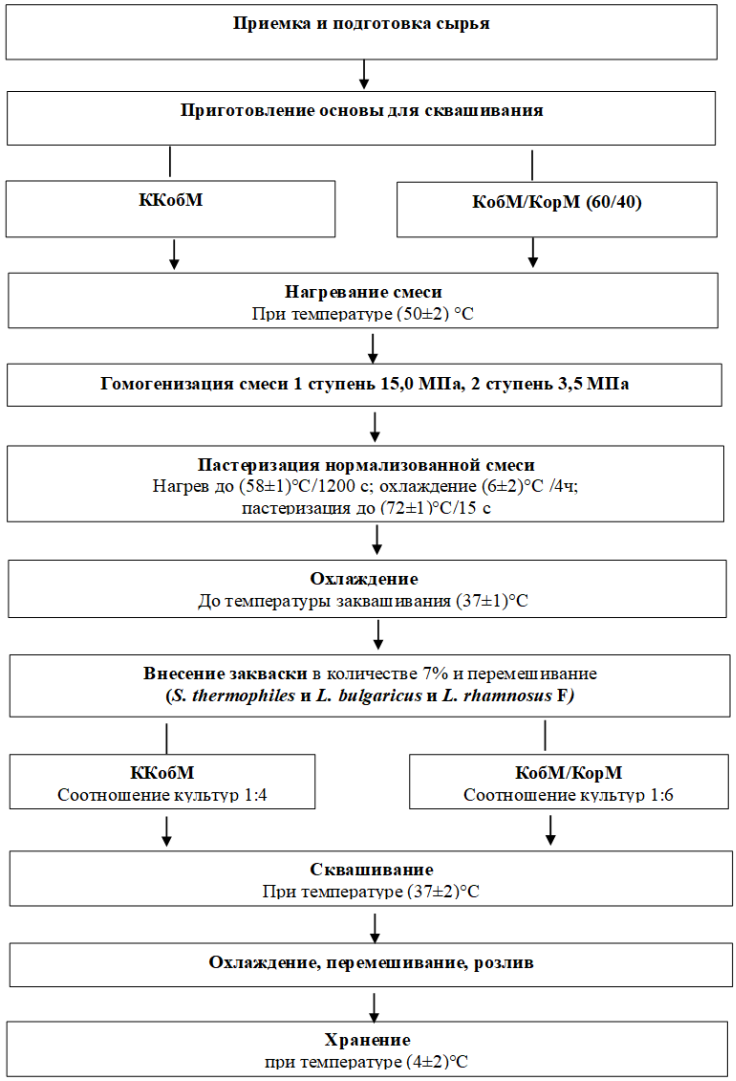


Рисунок 9 – Технологическая схема производства кисломолочных продуктов

На основе полученных результатов исследований разработана нормативная документация ТУ 10.51.52-162-00419006-2021 на КП для двух продуктов на основе ККобМ и КобМ/КорМ.

Проведены исследования функциональных свойств продуктов методами *in vitro* и *in vivo*. Исследования антиоксидантного потенциала КП методом *in vitro* подтвердили высокую антиоксидантную активность, значения которых превышали значения образца на основе КорМ на 33,7–48,6%.

Исследования антимикробной активности КП методом *in vitro* показали наибольшую антимикробную активность разработанных продуктов по отношению к *E. coli* АТСС 25922. Диаметр зоны ингибирования *E. coli* АТСС

25922 составил 14±0,5 мм для продукта на основе ККобМ и 15±0,5 мм для продукта на основе КобМ/КорМ. По отношению к *S. aureus* АТСС 6538 и *Salmonella typhimurium* АТСС 14028 разработанные КП показали одинаковую антимикробную активность, диаметр зоны ингибирования роста тест-штаммов составил 12,5–13 мм. Наличие зон ингибирования роста условно-патогенных микроорганизмов позволяют утверждать о наличии высокой антимикробной активности разработанных продуктов.

В результате анализа жирнокислотного состава КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ установлены низкие значения индекса атерогенности (1,22).

Исследования функциональных свойств КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ *in vivo* на модели неалкогольного стеатоза у мышей.

На фоне «западной» диеты (WD) КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ вызывал статистически значимое снижение количества гранулоцитов (на 27,4% при p=0,024 относительно группы 4 (контрольные животные, потребляющие WD). Снижение гранулоцитов в крови мышей, потреблявших на фоне WD продукт на основе ККобМ и Коб/КорМ, свидетельствует о нивелировании воспаления.

Выявленные у животных, потреблявших WD, изменения липидного профиля сыворотки крови, наблюдались у мышей, которым параллельно с жирной диетой скармливали КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ (увеличение общего холестерина до 65% при p<0,05 и его фракций – ХС ЛПНП в 2 раза). При этом при потреблении на фоне WD КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ приводило к снижению ХС ЛПНП (на 17,6% при p=0,005 по сравнению с группой сравнения) при увеличении содержания ХС ЛПВП (на 30,0% при p=0,015 относительно интакта). В плазме крови животных групп 2 и 1 (животные потребляющие КП на основе ККобМ и Кобм/КорМ), в рацион которым вводили продукты сравнения, содержание ХС ЛПНП увеличивалось на 26,2% (p=0,003) и 16,7% (p=0,021) относительно группы контроля. Величина индекса атерогенности плазмы крови мышей группы контроля, потреблявших WD и КП на ККобМ и КобМ/КорМ, превышала данный показатель группы 5 (интактные животные, потребляющие стандартный рацион вивария) на 75,0% (p<0,001), тогда как у мышей группы 4 (контрольные животные, потребляющие WD) – на 87,5% (p<0,001), у мышей группы 2 – на 80,0% (p<0,001) и у мышей группы 1 – на 85,0% (p<0,001). Также в плазме крови мышей группы контроля, потреблявших WD и КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ, наблюдалось выравнивание метаболических показателей (креатинин и мочевина) и активности фермента АЛТ, отмеченные у контрольных животных. Гистологические исследования печени групп 1 и 2 показали заметное снижение плотности окрашивания печени (относительно контрольной группы более чем в 3 раза). Относительная масса печени мышей контрольной группы снижалась на 23,3% (p=0,007) относительно группы 2 и на 15,5% (p=0,002) относительно группы 1. У мышей группы 1 отмечено снижение относительной массы висцерального жира (на 23,8% относительно мышей группы контроля).

Установлено, что образцы КП при потреблении на протяжении 24 суток совместно с моделированием неалкогольной жировой дистрофии печени обладают противовоспалительным и гепатопротекторным эффектами.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенного социологического исследования установили предпочтительное отношение (70% респондентов) потребителей к продуктам функциональной направленности на основе КобМ. Разработаны МБТ на КП учитывающие особенности КобМ в сочетании с пробиотическими и молочнокислыми микроорганизмами, что в совокупности обеспечивает функциональную направленность продуктов.

2. Разработана система идентификации КобМ, которая включает органолептические, физико-химические, биохимические критерии. По результатам проведенных исследований установлены параметры применения метода ВЭЖХ для идентификации КобМ. Доказано, что маркером видовой принадлежности КобМ в смеси с КорМ является α-ла. Метод позволяет достоверно определить не менее 7% добавленного КорМ к КобМ.

3. Выявлено влияние режимов пастеризации КобМ, ККобМ, КобМ/КорМ на физико-химические, микробиологические и органолептические показатели. Наиболее ощутимые негативные изменения в органолептических показателях обнаружены при температуре пастеризации выше (68±1)°С и продолжительности выдержки более 1200 с (20 мин). Установлено, что для обеспечения гарантированного органолептического и микробиологического качества наиболее рациональным и технологичным является двухступенчатой режим, включающий термизацию при (58±1)°С/1200 с, охлаждение до (6±2)°С, выдержку 4 ч, и последующую пастеризацию (72±1)°С/15 с.

4. Обоснована комбинация бактериальной закваски, состоящая из *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* и *L. rhamnosus* F в соотношениях 1:4, 1:6, исследованы режимы ферментирования ККобМ и КобМ/КорМ. Установлено, что для получения КП на основе ККобМ рациональным является соотношение культур 1:4, продолжительность сквашивания 8 ч, а для получения КП на основе КобМ/КорМ соотношение 1:6, продолжительность сквашивания 6,5 ч, доза инокулята составляет 7%. В продуктах в течение всего срока годности (30 суток) содержание *L. rhamnosus* F отмечается на уровне не ниже 10^6 КОЕ/см^3.

5. Результаты *in vitro* и *in vivo* подтвердили функциональную направленность разработанных КП. Доказано, что КП проявляют высокую антиоксидантную и антимикробную активности по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам – *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. В результате анализа жирнокислотного состава и расчетов индексов для КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ установлены низкие значения индекса атерогенности (1,22). Доказаны противовоспалительные и гепатопротекторные эффекты продуктов.

6. Научно обоснована, разработана технология и утвержден комплект нормативной документации на КП на основе ККобМ и КобМ/КорМ функциональной направленности ТУ 10.51.52-162-00419006-2021, установлены рекомендуемые сроки годности, проведена промышленная апробация продукта.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации:

Статьи в журналах, индексируемые в Scopus

1. Курченко, В.П. Идентификация кобыльего молока и его смеси с коровьим молоком методом ВЭЖХ-анализа / В.П. Курченко, **Е.С. Симоненко**, Н.В. Сушинская, Т.Н. Головач, А.Н. Петров, С.В. Симоненко // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51. – № 2. – С. 402–412. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-402-412.

2. **Симоненко, Е.С.** Разработка кисломолочного продукта на основе кобыльего молока и ассоциации молочнокислых микроорганизмов / Е.С. Симоненко, А.В. Бегунова // Вопросы питания. – 2021. – Т. – 90. – № 5. – С. 115–125. https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-5-115-125.

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

3. Золотин, А.Ю. Потребительская ценность пищевого продукта и системогенез производства / А.Ю. Золотин, С.В. Симоненко, **Е.С. Симоненко,** М.С. Копытко // Пищевая промышленность. – 2020. – № 10. – С. 38–40. https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10103.

4. Золотин, А.Ю. Роль ингредиентов в формировании потребительской ценности пищевого продукта / А.Ю. Золотин, С.В. Симоненко, **Е.С. Симоненко** // Пищевая промышленность. – 2020. – № 3. – С. 29–33. https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10030.

5. Золотин, А.Ю. Методология разработки пищевых продуктов / А.Ю. Золотин, С.В. Симоненко, Т.А. Антипова, С.В. Фелик, **Е.С. Симоненко**, А.Е. Седова // Пищевая промышленность. – 2019. – № 11. – С. 50–55. https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10177.

6. Симоненко, С.В. Методы идентификации молока и молочной продукции / С.В. Симоненко, **Е.С. Симоненко,** Т.А. Антипова, С.В. Фелик // Пищевая промышленность. – 2019. – № 4. – С. 92–94. https://doi.org/ 10.24411/0235-2486-2019-10047.

7. Золотин, А.Ю. Вопросы терминологии при исследовании органолептического восприятия пищевых продуктов / А.Ю. Золотин, С.В. Симоненко, Н.А. Шахайло, Т.А. Антипова, С.В. Фелик, **Е.С. Симоненко** // Пищевая промышленность. – 2017. – № 12. – С. 35–37.

8. **Симоненко, Е.С.** Разработка методики оценки органолептического восприятия пищевого продукта / Е.С. Симоненко, А.Ю. Золотин, С.В. Симоненко, О.В. Бессараб // Пищевая промышленность. – 2021. – № 6. – С. – 57–62. https://doi.org/10.52653/PPI.2021. 6.6.006.

9. **Симоненко, Е.С.** Перспективы использования кобыльего молока для создания продуктов диетического лечебного и диетического профилактического питания / Е.С. Симоненко, С.В. Симоненко, Ю.С. Хованова // Международный научно-исследовательский журнал. – 2021. – № 12 – 1(114). – С. 157–161. https://doi.org/10.23670/IRJ.2021.114.12.026.

10. **Симоненко, Е.С.** Современные кисломолочные продукты на основе кобыльего молока функциональной направленности / Е.С. Симоненко // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. – № 3 (117). – Ч.2. – С. 6–9. https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.117.3.038.

11. **Симоненко, Е.С.** Исследование хранимоустойчивости кисломолочного продукта на основе кобыльего молока / Е.С. Симоненко // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. – № 2 (116). – С. 163–168. https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.116.2.028.

12. **Симоненко, Е.С.** Исследование режимов термической обработки кобыльего молока и кобыльего молока с добавлением коровьего / С.В. Симоненко, М.С. Копытко // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. – № 3 (117). – Ч.2 – С. 10–13. https://doi.org/10.23670/ IRJ.2022.117.3.039.

Материалы конференций и другие публикации

13. Золотин, А.Ю. Связь консистенции и органолептического восприятия продукта / А.Ю. Золотин, **Е.С. Симоненко,** А.Е. Седова, С.В Фелик // Вопросы питания. – 2018. – Т. – 87. – № S5. – С. 136–137. https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10235.

14. Симоненко, С.В. Разработка специализированных продуктов для детского питания на основе комбинированного молока / С.В. Симоненко, Е.В. Сидорова, Т.А. Антипова, Б.М. Мануйлов, **Е.С. Симоненко** // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87. – № S5. – С. 237–238. https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10348.

15. Симоненко, С.В. Продукты из комбинированного молочного сырья для питания детей дошкольного и школьного возраста / С.В. Симоненко, Б.М. Мануйлов, **Е.С. Симоненко,** Е.Н. Сидорова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2018. – Т. 63. – № 4. – С. 174–175.

Изобретения

16. Патент РФ № 2729163. Способ получения адаптированной сухой молочной смеси на основе кобыльего молока для детского питания. ТА. Антипова, С.В. Фелик, С.В. Симоненко, **Е.С. Симоненко**, О.В. Кудряшева, А.Т. Акмолдаев. Заявл. № 2019136288 от 12.11.2019 г. Опубл. 04.08.2020. Бюл. № 22.

Перечень сокращений и условных обозначений:

МБТ – медико-биологические требования;
КП – кисломолочный продукт;
КобМ – кобылье молоко;
ККобМ – кобылье молоко с повышенным содержанием сухих веществ до 15 %;
КобМ/КорМ – кобылье молоко с добавлением коровьего молока;
КорМ – коровье молоко;
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты;
НЖК – незаменимые жирные кислоты;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
β-лг – β-лактоглобулин;
α-ла – α-лактоальбумин;
БГКП – бактерии группы кишечных палочек;
WD – «Западная диета»
ХС ЛПНП – липопротеины низкой плотности;
ХС ЛПВП – липопротеины высокой плотности;
АЛТ – аланинаминотрансфераза.