

**ГЗ № 0833-2019-0023 «Разработать теоретические основы и принципы процессов и технологий производства биологически активных продуктов переработки винограда функциональной направленности»
(заключительный)**

Этап 2021 года: Проведение испытаний перспективных экспериментальных образцов инновационной продукции функциональной направленности по органолептическим, физико-химическим, показателям безопасности, пищевой ценности и на биологическую активность.

Результаты НИР по разработке принципов технологии производства биологически активных продуктов переработки винограда функциональной направленности, насыщенных полифенолами винограда

Руководитель:

Заведующая лабораторией функциональных
продуктов переработки винограда,
К.Т.Н

Черноусова И.В.

* Цель исследования

2

- * Получить экспериментальные партии образцов продукции (спиртосодержащий пищевой концентрированный экстракт виноградной выжимки, безалкогольный пищевой концентрат полифенолов из лозы винограда) для проведения экспериментальных испытаний по органолептическим, физико-химическим показателям, показателям безопасности, их антиоксидантных свойств и пищевой ценности с получением Протоколов испытаний.
- * Обобщить основные принципы технологии производства биологически активных продуктов переработки винограда функциональной направленности, насыщенных полифенолами винограда.

* Новизна исследований

3

- * Научная новизна исследований состоит
- * -в проведении экспериментальных испытаний экспериментальных образцов продукции по органолептическим, физико-химическим показателям, показателям безопасности, их антиоксидантных свойств и пищевой ценности с получением Протоколов испытаний.
- * -в исследовании антиоксидантных свойств пищевого спиртосодержащего концентрированного экстракта виноградной выжимки *in vivo* на модели ишемического повреждения миокарда экспериментальных животных и гипогликемического, липидоснижающего действия безалкогольного пищевого концентрата полифенолов лозы винограда на модели метаболического синдрома.
- * - в разработке нормативной документации на продукцию;
- * - в уточнении и систематизации сырьевого потенциала полифенолов виноградной грозди, лозы и листьев винограда и обобщении основных принципов технологии производства биологически активных продуктов переработки винограда функциональной направленности, насыщенных полифенолами винограда.

*** Задачи исследования:**

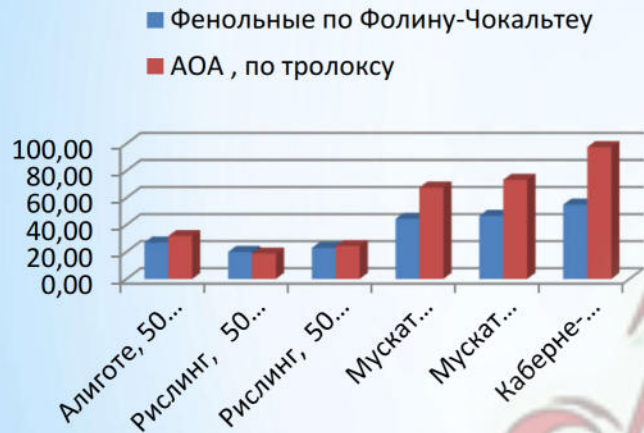
- * 1. Получить экспериментальные партии спиртосодержащего пищевого экстракта виноградной выжимки, безалкогольного пищевого концентрата полифенолов из лозы винограда. Определить качественный и количественный состав полифенолов в экспериментальных образцах продукции методом ВЭЖХ. Провести испытания экспериментальных образцов продукции по органолептическим, физико-химическим показателям, пищевой ценности, показателям безопасности с предоставлением Протоколов испытаний.
- * 2. Дать оценку антиоксидантных свойств экспериментальной продукции, насыщенной суммарными полифенолами винограда *in vivo*. (Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь.).
- * 3. На основе результатов испытаний экспериментальных образцов продукции доработать и представить окончательный вариант технологических инструкций.
- * 4. Разработать Стандарты организации:
 - * - «Экстракт виноградной выжимки спиртосодержащий пищевой». Технические условия;
 - * - «Концентрат полифенолов лозы винограда безалкогольный пищевой». Технические условия.
- * 5. Обобщить основные принципы технологии производства биологически активных продуктов переработки винограда функциональной направленности, насыщенных полифенолами винограда.

Выдержки из приложения 5 «Величины суточного потребления пищевых и биологически активных веществ в составе специализированных пищевых продуктов («Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» Глава II. Раздел 1)

Пищевые и биологически активные компоненты пищи, являющиеся ингредиентами пищевыми функциональными ГОСТ Р 54059-2010	Классификация и существенные признаки	Адекватный уровень потребления (в сутки), мг
Антоцианы	Антиоксидантное действие, питание и кровоснабжение сердечной мышцы	50
Оксибензойные кислоты галловая кислота сиреневая кислота	Антиоксидантная защита липидов клеточных мембран и липопротеидов	100
Флавоны кверцетин-3- О- гликозид кверцетин Флавоноиды Флаван-3-олы D-катехин эпикатехин	Активация метаболизма липидов Антиоксидантная защита полиненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах Сохранение тонуса стенок кровеносных сосудов и их проходимости Эффект поддержания деятельности сердечно-сосудистой системы	250
Полимерные фенольные соединения (олигомерные и полимерные процианидины)	Антиоксидантная защита полиненасыщенных жирных кислот в мембранных липидное действие Эффект поддержания деятельности сердечно-сосудистой системы (сосудорасширяющий эффект, антиаритмический эффект, антитромбическое действие)	400
Транс-ресвератрол	Активизирует механизмы клеточной регуляции, приводящие к естественному отмиранию «сбойных» клеток (апоптозу), проявляя противораковое действие. Профилактика заболеваний раком и нарушений сердечно-сосудистой системы. Эффективная нейропротекция	30

* Технологический запас фенольных веществ и водорастворимых антиоксидантов в образцах сырья

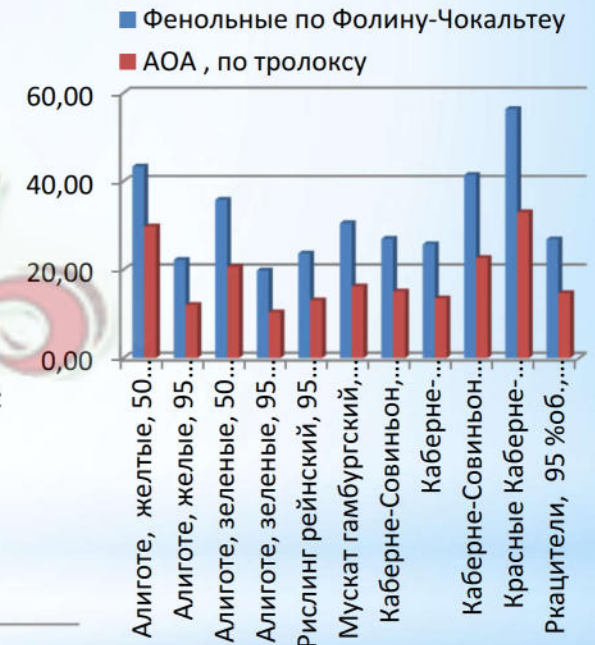
Технологический полный запас в виноградной выжимке в г/кг сух. веса



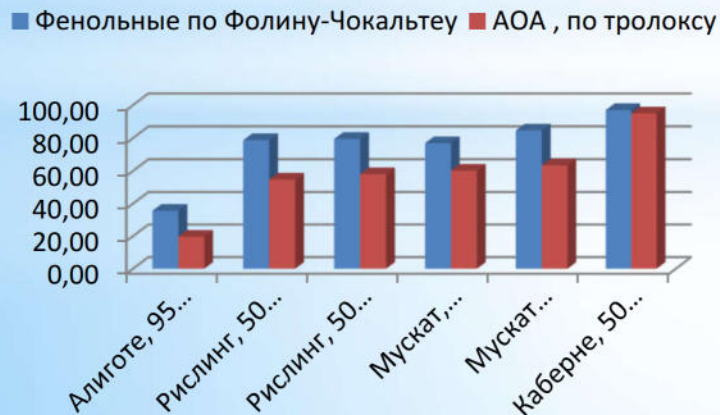
Технологический полный запас в виноградных семенах в г/кг сух. веса



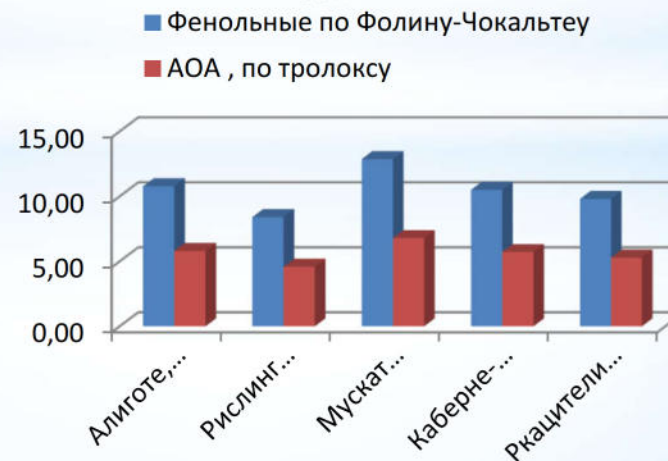
Технологический полный запас в виноградных листьях в г/кг сух. веса



Технологический полный запас в виноградных гребнях в г/кг сух. веса



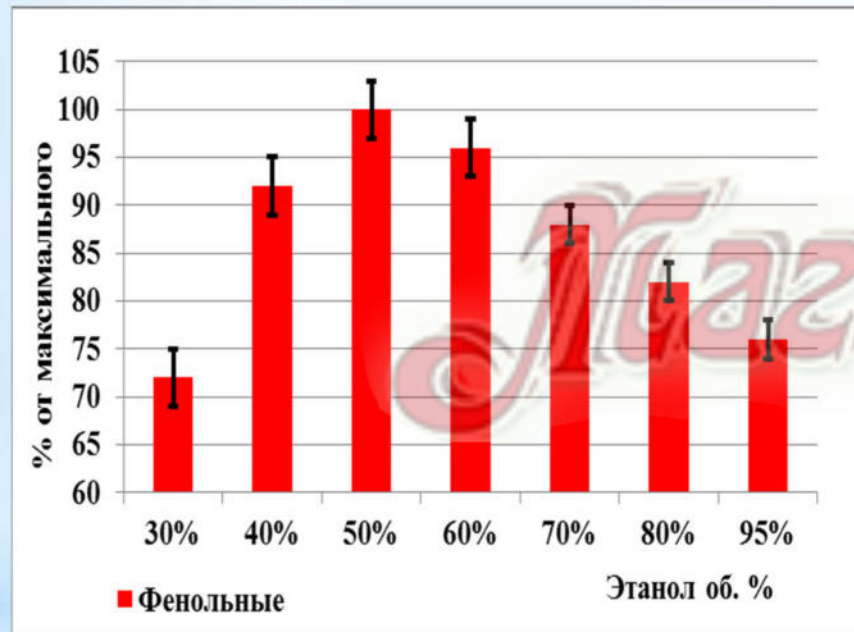
Технологический полный запас в виноградной лозе в г/кг сух. веса



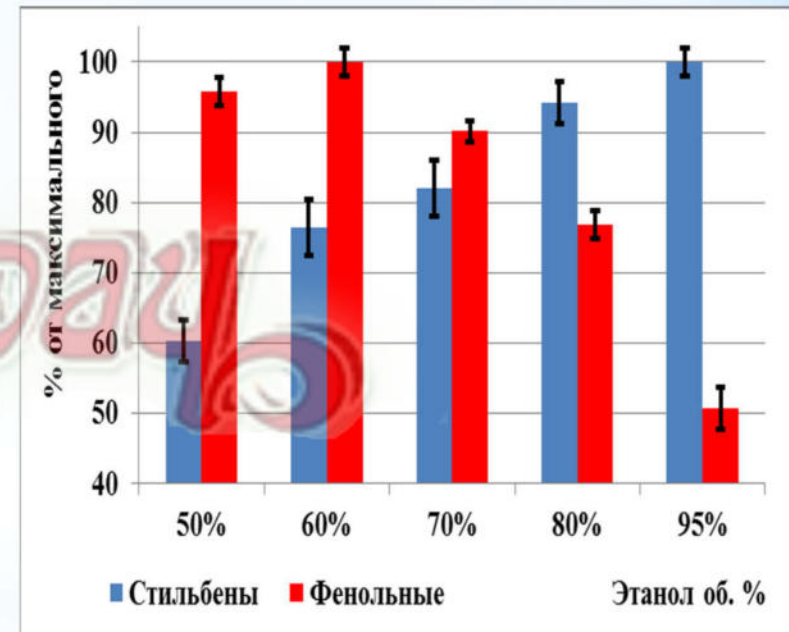
* **Равновесная концентрация фенольных веществ в спиртовых экстрактах в зависимости от объемной доли этанола в экстрагенте**

выжимка, гребни, семена

соотношение массы Т:Ж – 2:1.

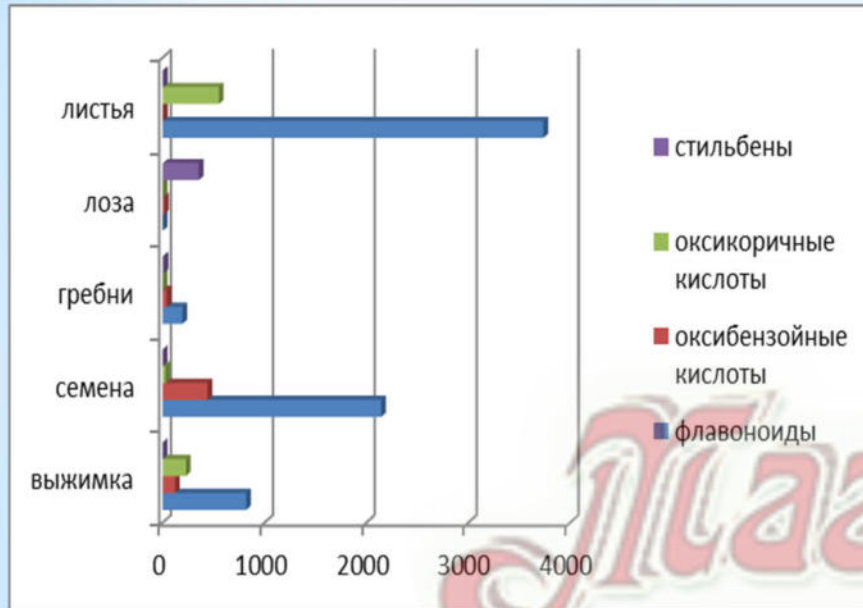


лоза, листья винограда
соотношение массы Т:Ж – 1:3,5

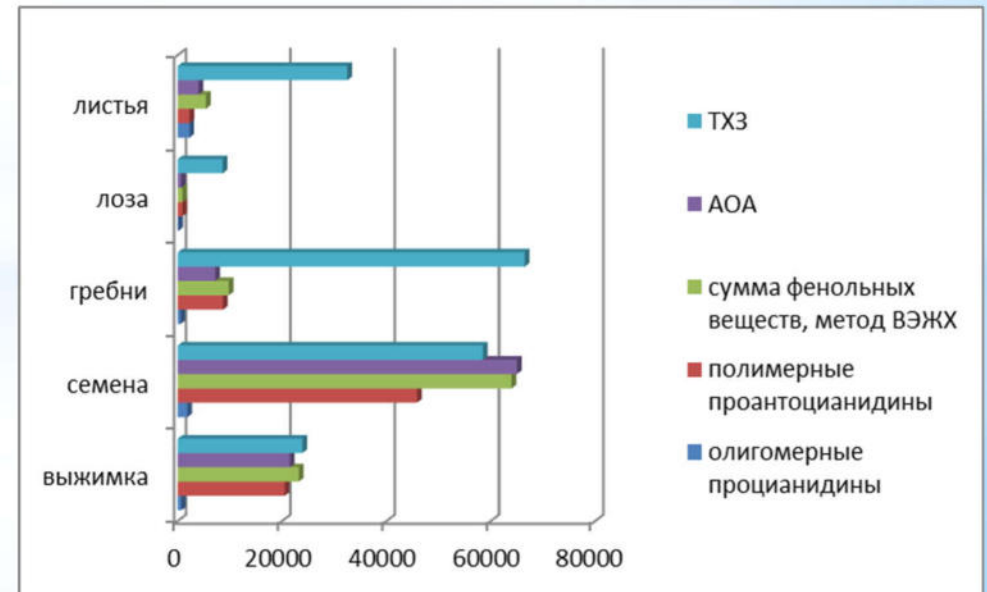
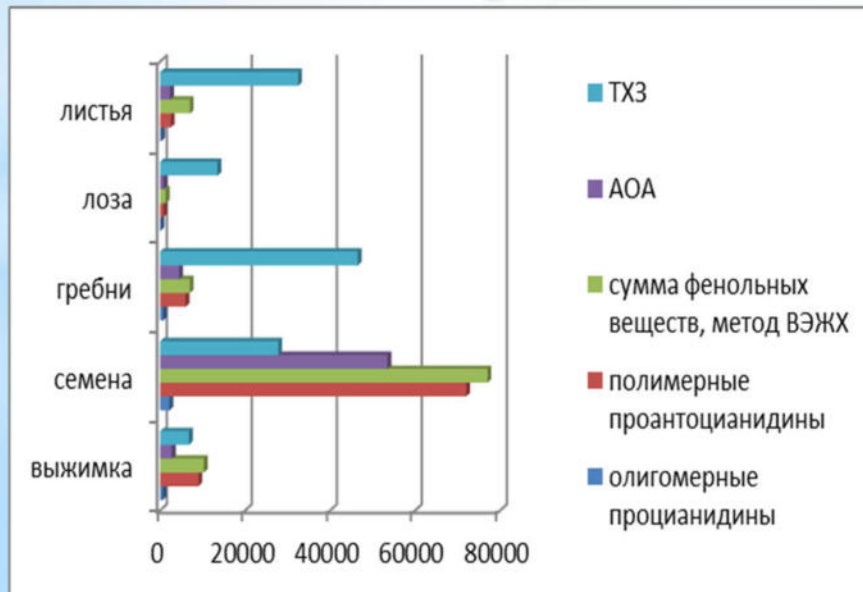
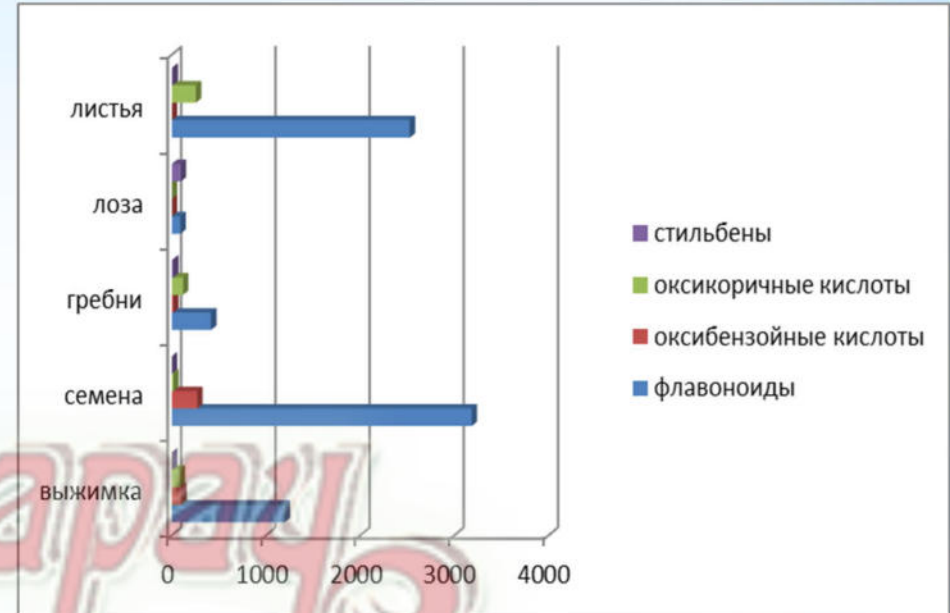


* **Мономерные и полимерные формы фенольных веществ спиртовых экстрактов виноградного сырья, ОАО, ТХЗ**

Белые сорта винограда



Красные сорта винограда

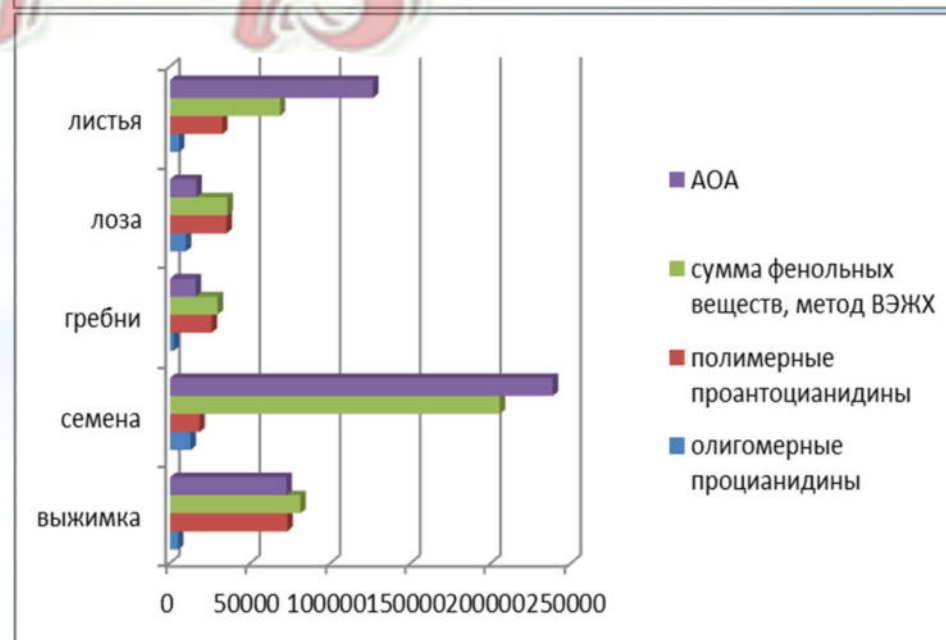
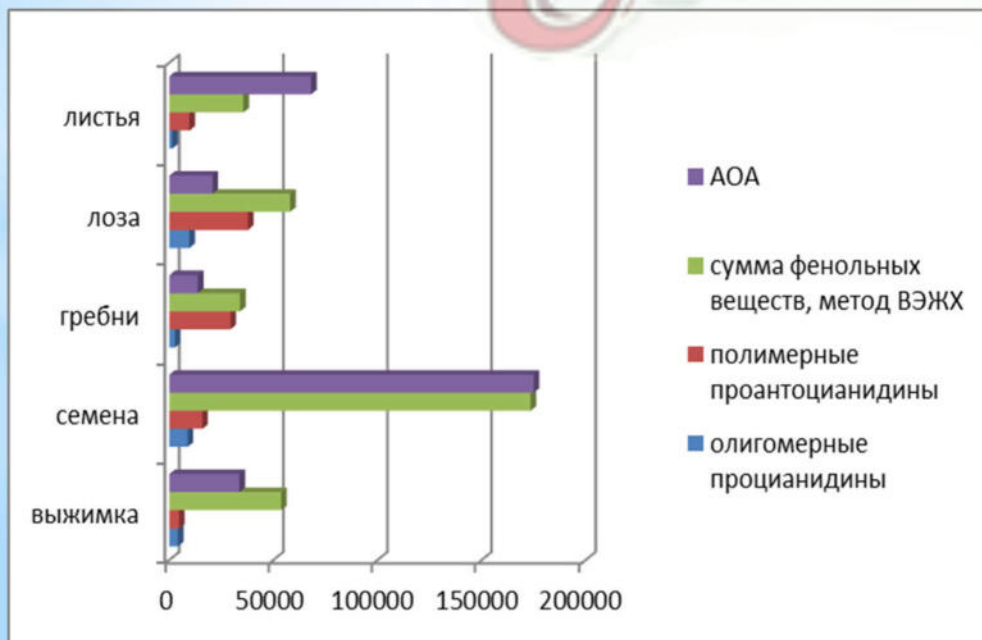
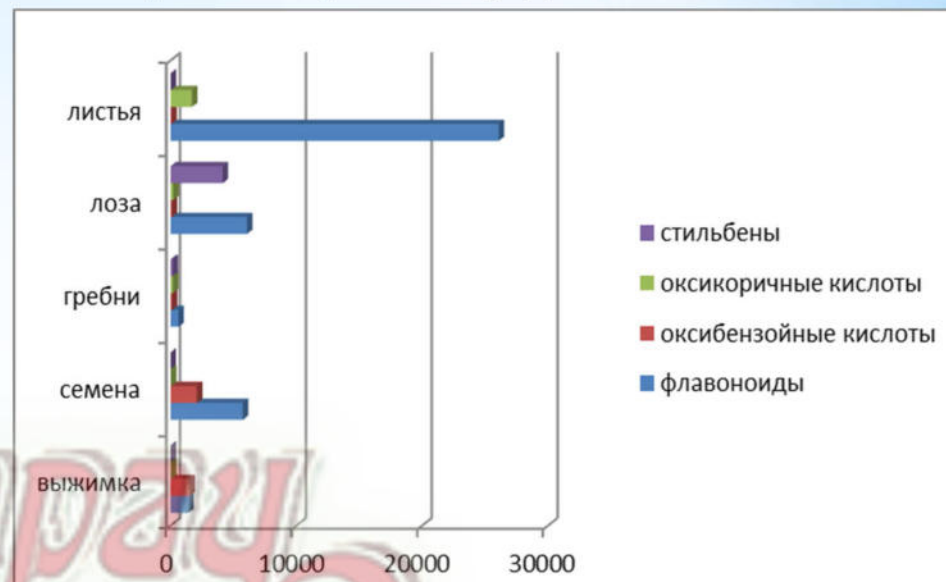


* Мономерные и полимерные формы фенольных веществ в концентратах виноградного сырья, ОАО

Белые сорта винограда



Красные сорта винограда



* **Количественный и качественный состав полифенолов в экспериментальных образцах продукции функционального питания из винограда** 10

Спиртосодержащий

пищевой концентрат из выжимки винограда

Безалкогольный пищевой концентрат

из лозы винограда

Наименование компонента	Концентрация компонентов, мг/дм ³
<i>Антоцианы, Сумма</i>	2,7
Флаван-3-олы	
(+)-D-Катехин	98,1
(-)-Эпикатехин	102,0
<i>Сумма</i>	200,1
Флавоны	
Кверцетин	18,0
Кверцетин-3-О-глюкозид	17,2
<i>Сумма</i>	35,0
Оксибензойные кислоты	
Галловая кислота	436,4
Оксикоричные кислоты	
Кафтаровая кислота	15,4
Каугаровая кислота	2,4
Олигомерные проантоцианидины	488,6
Полимерные проантоцианидины	23516,5
Сумма полифенолов ВЭЖХ, г/дм³	24,7
Сумма фенольных веществ по Фолину-Чокальтеу, г/дм³	19,6

Наименование компонентов	Концентрация компонентов, мг/дм ³
Оксибензойная кислота	
Галловая кислота	23,1
Флаван-3-олы	
(+)-D-Катехин	314,1
(-)-Эпикатехин	330,0
<i>Сумма</i>	544,1
Транс-Ресвератрол	708,4
ε- виниферин	1049,2
Транс- пицеид	27,3
пикеатаннол	100,7
Не идентифицированные стильбены	160,6
Сумма всех стильбенов	2058,1
Олигомерные процианидины	782,0
Полимерные проантоцианидины	6642,5
Сумма полифенолов ВЭЖХ, г/дм³	10,2
Сумма фенольных веществ по Фолину-Чокальтеу, г/дм³	9,2

* **Пищевая ценность экспериментальных образцов продукции**

Пищевая ценность продукта питания определяется:

- органолептическими характеристиками
- химическим составом
- энергетической ценностью
- биологическим значением продукта
- безвредностью продукта

* Формула, учитывающая энергетические коэффициенты компонентов, входящих в состав экспериментальных образцов.

$$* \text{ЭН (ккал/100 см}^3\text{)} = \text{ЭН}_{\text{этилового спирта}} + \text{ЭН}_{\text{сахаров}} + \text{ЭН}_{\text{органических кислот}} + \text{ЭН}_{\text{фенольных веществ}}$$

где ЭН- энергетическая ценность экспериментальных образцов продукции, ккал/100 см³;

ЭН_{этилового спирта} - энергетическая ценность этилового спирта, ккал/100 см³;

ЭН_{сахаров} - энергетическая ценность сахаров, ккал/100 см³;

ЭН_{органических кислот} - энергетическая ценность органических кислот, ккал/100 см³;

ЭН_{фенольных веществ} - энергетическая ценность фенольных веществ, ккал/100 см³

Наименование образца	Количество, г/100г продукта				Энергетическая ценность, ккал (кДж)
	спирт	сахара	органические кислоты	фенольные вещества	
спиртосодержащий пищевой концентрированный экстракт выжимки винограда красных сортов	10,5	23,9	0,65	2,26	187,0 (779)
безалкогольный пищевой концентрат полифенолов из лозы винограда	0,3	43,3	0,18	0,98	174,0 (726)

Биохимические маркеры

Свободнорадикальное окисление липидов в сыворотке оценивали по:

- ▶ концентрации ТБК-активных продуктов

Определение антиокислительного потенциала включало:

- ▶ пероксидазоподобную активность
- ▶ каталазоподобную активность
- ▶ уровень церулоплазмина
- ▶ супероксиддисмутазу

* **Окислительно-антиоксидантный гомеостаз крови крыс**

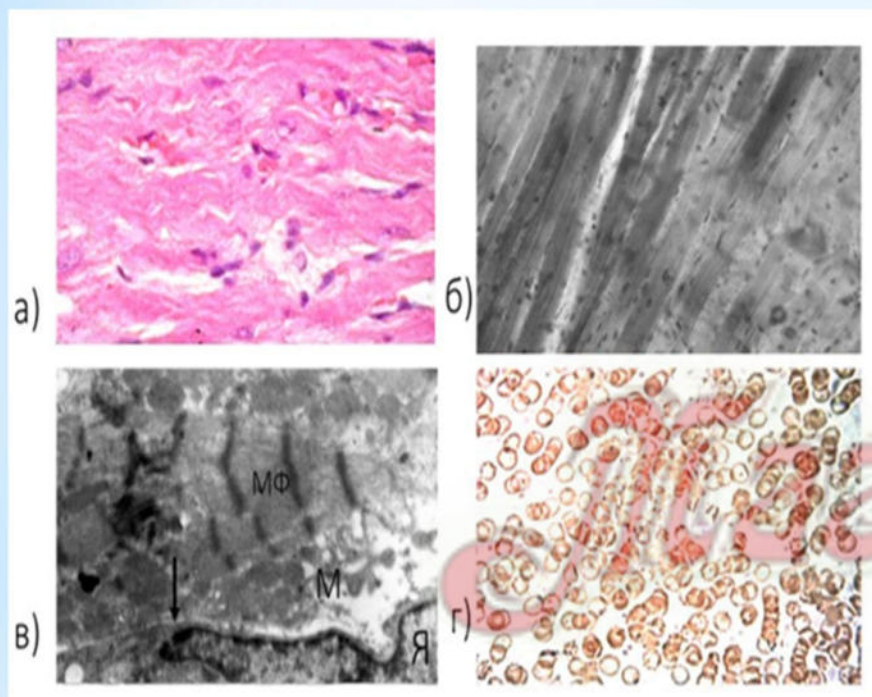
Влияние полифенольного продукта переработки винограда на состояние ПОЛ в сыворотке крыс с моделью гипоксии

Показатель Серия		ТБК-АП нММДА/ мл	КПА мМ/gHb· с	ЦП мг/л
Контроль	М±	120,67±4,	0,21±0,0	219,42±7
	m	52	1	,61
CoCl ₂	М±	231,25±6,	0,15±0,0	305,14±8
	m	17	1	,82
CoCl ₂ + ЭВВ	М±	152,23±4,	0,20±0,0	242,34±5
	m	76	2	,82

Состояние антиоксидантной защиты крови крыс с моделью гипоксии и влияние на нее полифенольных продуктов переработки винограда

Показатель Серия		СОД Ед/мл	ППА мМ/gHb·с
Контроль	М±m	140,25±6,20	3,17±0,13
CoCl ₂	М±m	97,08±5,10	2,16±0,12
CoCl ₂ + ЭВВ	М±m	127,42±4,38	2,57±0,09

***Морфологические изменения миокарда самцов крыс в условиях гистоксической гипоксии и после коррекции полифенольными продуктами**

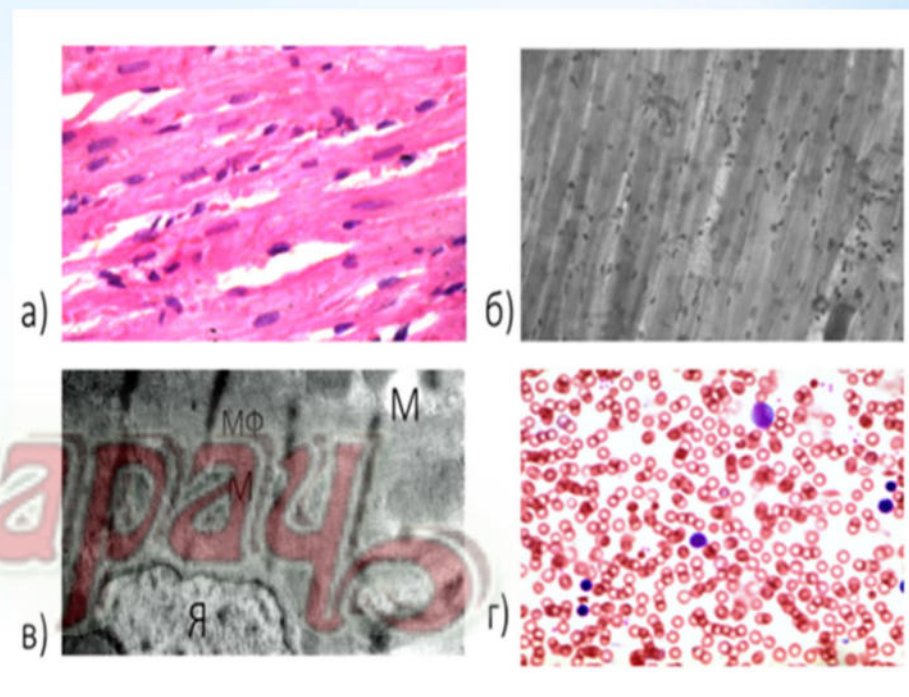


а) Признаки отека миокарда. Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. x 1000.

б) Диффузные темно-серые, местами разволокненные саркомеры миокарда. Окрашивание по Рего. Ув. x 400.

в) Появление остроконечных инвагинатов ядра (Я) кардиомиоцитов (стрелки), отек перинуклеарного пространства, деструкция крист мелких гетерогенных митохондрий (М), накопление электронноплотных включений в миофибриллах (МФ). ТЭМ. Ув. x 18000.

г) Признаки анемии: гипохромия эритроцитов. Окрашивание по Романовскому-Гимзе. Ув. x 1000.



а) Признаки отека миокарда с достаточно четким окрашиванием ядер кардиомиоцитов. Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. x 1000.

б) Единичные темно-серые саркомеры миокарда. Окрашивание по Рего. Ув. x 400

в) Просветление нуклеоплазмы ядра (Я), появление гигантских митохондрий с плотноупакованными кристами (М), сохранение структуры миофибрилл (МФ). ТЭМ. Ув. x 19000.

г) Умеренно выраженная гипохромия эритроцитов. Окрашивание по Романовскому-Гимзе. Ув. x 1000

*** Изменение биохимических показателей в крови экспериментальных животных при модельном метаболическом синдроме и его коррекция концентратом полифенолов из лозы винограда**

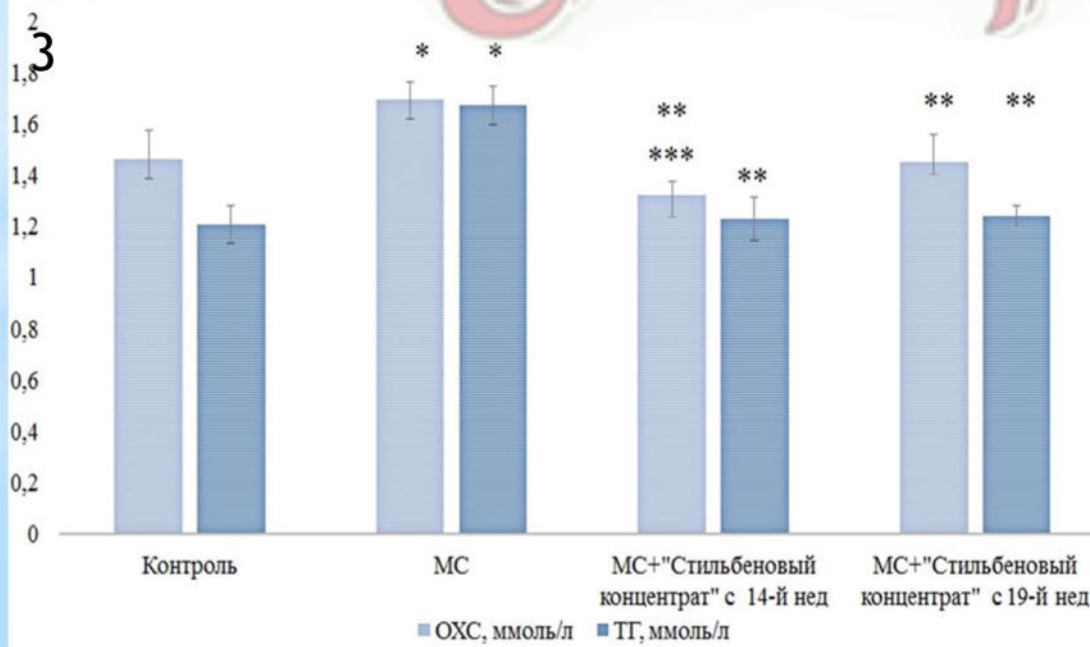
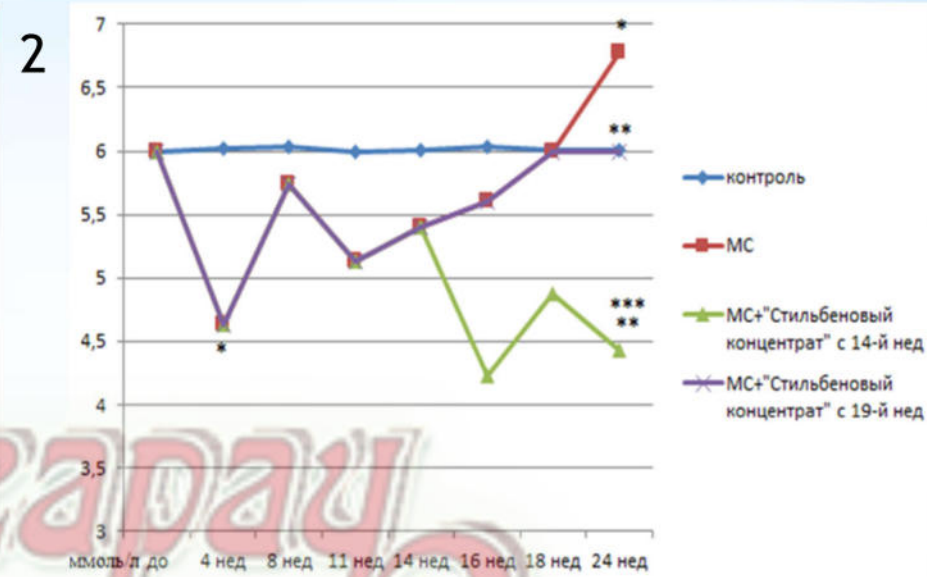
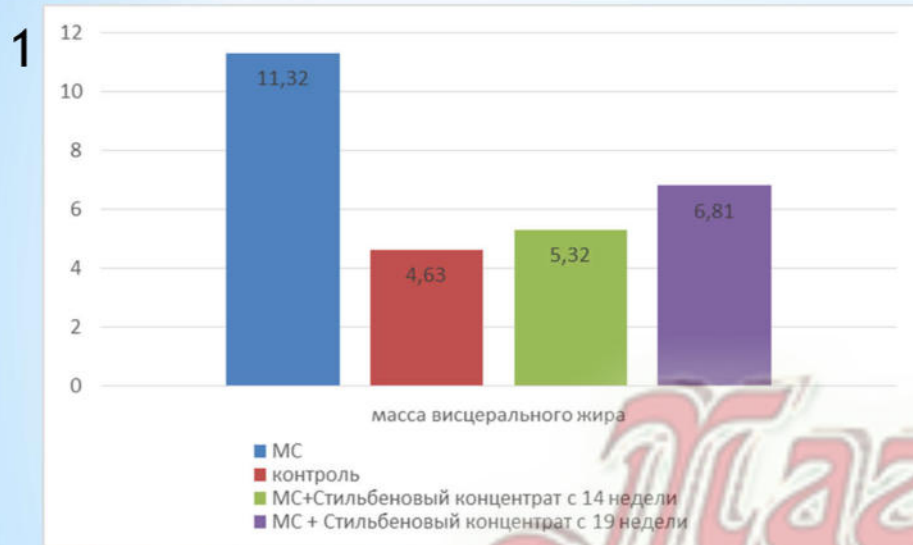


Рис.1 Масса висцерального жира в эксперименте;

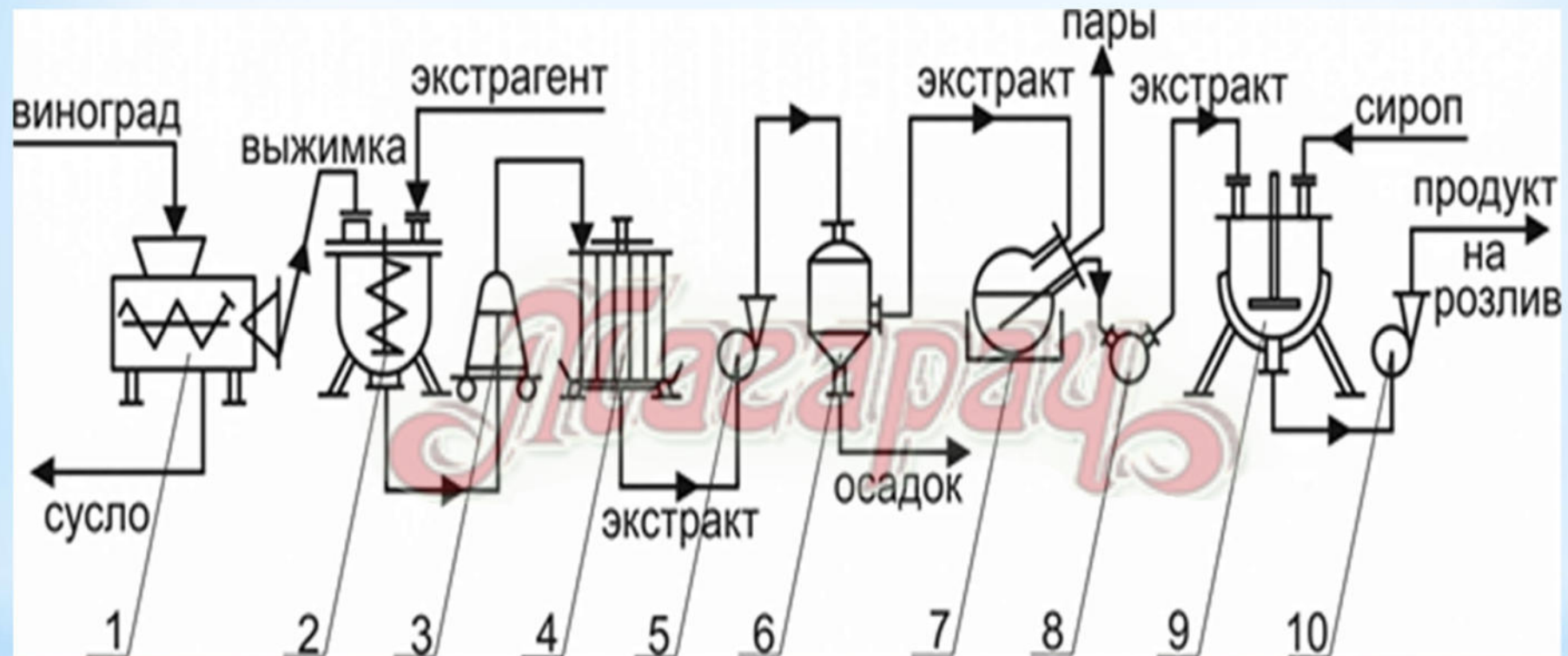
Рис. 2 Уровень глюкозы в эксперименте;

Рис. 3 Уровень общего холестерина и триглицеридов в эксперименте

*** Основные принципы технологии получения продуктов функциональной направленности из виноградного сырья**

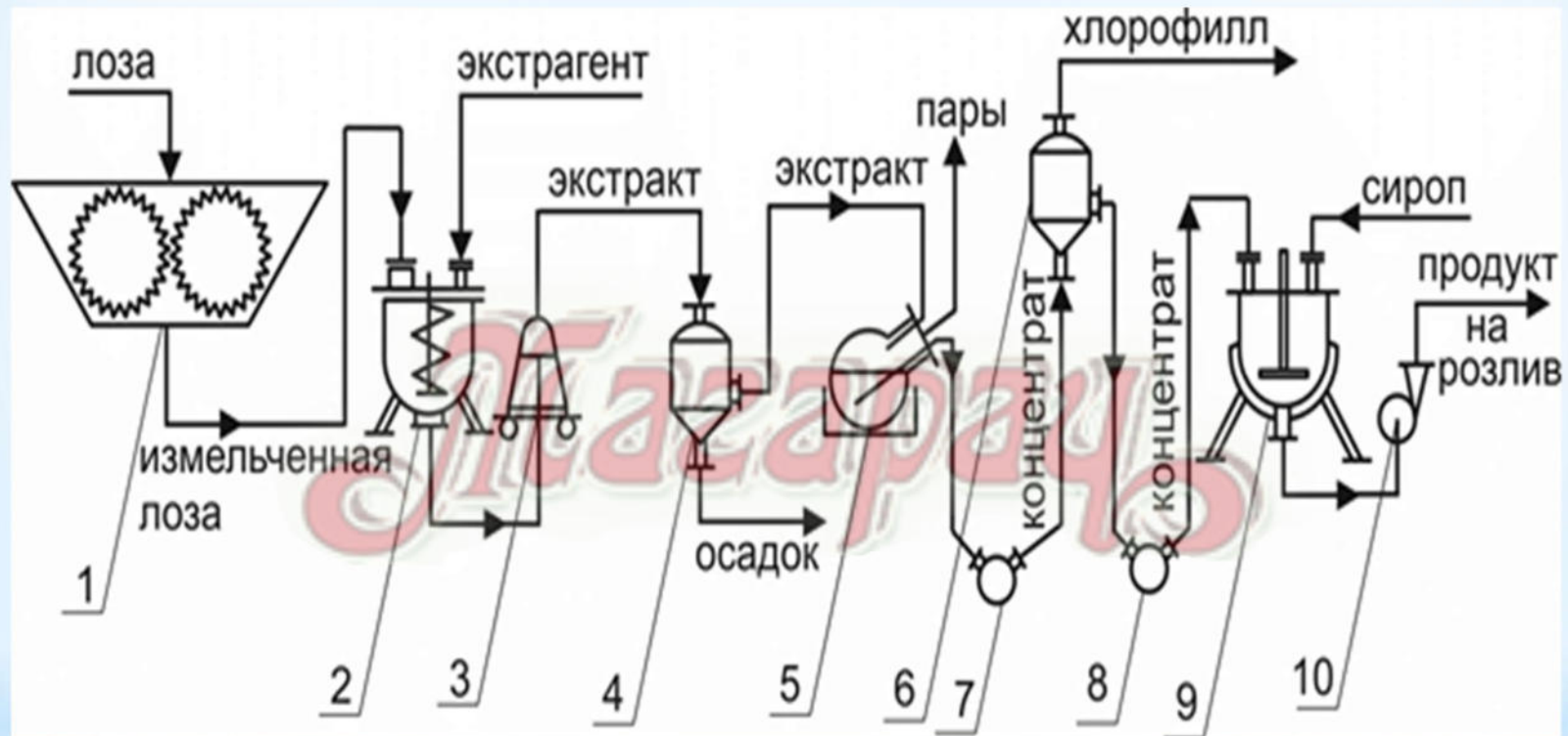
Основные принципы	Наименование виноградного сырья				
	выжимка	семена	гребни	лоза	листья
Определение технологического запаса одностадийной экстракции виноградного сырья, (ТЗФВ), г/кг сухой массы	от 6,5 до 24,0	от 19,5 до 76,0	от 35,0 до 74,0	от 7,5 до 12	от 18 до 59,0
Массовая концентрация суммы фенольных веществ в виноградном сырье, г/дм ³	не менее 10	не менее 30	не менее 7,0	не менее 0,5	не менее 5,0
Доля влаги в виноградном сырье, %	не более 55,0	не более 40,0	не более 65	не более 45	не более 65
Степень измельчения виноградного сырья	Без измельчения	Без измельчения	Не менее 11 мм	Не менее 11 мм	Не менее 11 мм
Концентрация этанола в водно-спиртовом экстрагенте, % об.	50	50	50	95 % для экстракции стильбеновых веществ	95 % для экстракции стильбеновых веществ
Соотношение масс виноградного сырья и водно-спиртового пищевого экстрагента при постановке на экстракцию настаиванием	1:2	1:2	1:3	1:3	1:3
Время проведения экстракции, сутки	не менее 60	не менее 60	не менее 60	не менее 45	не менее 75
Температурный режим экстракции настаиванием, °С	не менее 10	не менее 10	не менее 10	не менее 10	не менее 10
Концентрирование спиртовых экстрактов	испарением этанола отгонкой под вакуумом при температуре 40-50 °С и остаточном давлении 0,1-0,2 атм	испарением этанола отгонкой под вакуумом при температуре 40-50 °С и остаточном давлении 0,1-0,2 атм до содержания этанола не более 0,5 % об.			
Стабилизация	Пастеризация при температуре не выше 80 °С. Купажирование с инвертированным сахарным сиропом				

* Принципиальная технологическая схема получения концентрированного спиртового экстракта полифенолов из виноградной выжимки



1. Пресс стекатель 2. Экстрактор 3. Насос 4. Пресс корзиночный 5. Насос экстракта 6. Отстойник 7. Ротационный вакуумный испаритель 8. Насос экстракта 9. Купажер 10. Продуктовый насос

* **Принципиальная технологическая схема получения безалкогольного пищевого концентрата полифенолов виноградной лозы**



1. Дисковый измельчитель 2. Экстрактор 3. Насос 4. Отстойник
 5. Ротационный вакуумный испаритель
 6. Отстойник 7,8. Насос концентрата 9. Купажер 10. Продуктовый насос

* Результаты исследований

1. Полифенолы водно-этанольных экстрактов выжимки, гребней, семян виноградной грозди, исследованных белых и красных сортов винограда технологической зрелости представлены флавоноидными и нефлавоноидными мономерами, проантоцианидинами олигомерной и полимерной структуры, при этом большую часть комплекса фенольных веществ (64,9-96,9%) составляют проантоцианидины.

Технологический запас фенольных веществ в выжимке, гребнях, семенах, извлекаемый одностадийной водно-этанольной экстракцией при высоком показателе антиоксидантной активности, позволяет применять твердые части виноградной грозди исследованных сортов как возобновляемый надежный источник полифенолов для производства на их основе функциональных пищевых продуктов.

2. Получены стабильные концентраты полифенолов из виноградного сырья (выжимки, семян, гребней, лозы, листьев). Максимальное содержание комплекса полифенолов достигается в концентратах семян (217 г/дм³), в концентратах выжимки винограда красных сортов (83 г/дм³), при этом для получения концентратов, обогащенных стильбеноидами (транс-ресвератролом и его производными), наиболее перспективным сырьем является лоза, позволяющая получать концентраты, содержащие 1,5-4,5 г/дм³ стильбенов, что на несколько порядков превышает максимальное содержание в лучших красных винах.

3. Установлена *in vitro* экспериментальная оценка показателя суммарного содержания водорастворимых антиоксидантов в концентратах из виноградного сырья в единицах стандартного антиоксиданта тролокс. Установлено, что данный в концентратах семян винограда белых и красных сортов составляет от 170 до 230 г/дм³, что превышает аналогичный показатель в концентратах гребней в 8 раз, в концентратах выжимки из винограда белых сортов в 6 раз, в концентратах выжимки из винограда красных сортов в 3 раза.

Результаты исследований

4. Впервые получен экспериментальный стабильный спиртосодержащий концентрированный пищевой экстракт виноградной выжимки с общим содержанием полифенолов 19,6 г/дм³. Экспериментально установлены органолептические, физико-химические показатели концентрированного пищевого спиртосодержащего экстракта выжимки красных сортов винограда (ЭВВ). Рекомендуемая доза приема экспериментального концентрированного пищевого спиртосодержащего экстракта виноградной выжимки, с учетом концентрации в нем фенольных веществ, 19,6 г/дм³ составляет 0,45-0,50 мл/кг веса человека, в сутки, с учетом адекватной суточной дозы потребления полифенолов в количестве 0,680-0,700 г. Энергетическая ценность ЭВВ составила 187 ккал (779 кДж).

Разработаны:

- стандарт организации СТО 01580301.034-2021. Экстракт виноградной выжимки спиртосодержащий концентрированный пищевой Технические условия;
- технологическая инструкция по экспериментальному производству пищевого спиртосодержащего экстракта виноградной выжимки ТИ 01580301.004-2020

5. Экспериментальные испытания экспериментального образца продукции пищевого спиртосодержащего концентрированного экстракта виноградной выжимки (ЭВВ) *in vivo* на модели ишемического повреждения миокарда экспериментальных животных, вызванных хлоридом кобальта, продемонстрировали цитопротекторные свойства, позволяющие в большей степени сохранить структуру миокарда крыс в условиях ишемии миокарда. Сохранение морфологической и ультраструктурной картины в миокарде сопровождалось достоверным уменьшением активации оксидантов и более высоким уровнем антиоксидантной активности в крови экспериментальных животных.

Результаты исследований

6. Впервые получен экспериментальный стабильный безалкогольный образец концентрата из лозы винограда с общим содержанием полифенолов $9,2 \text{ г/дм}^3$, в том числе $2,058 \text{ г/дм}^3$ стильбеновых веществ. Установлено, что в комплексе полифенолов концентрата из лозы присутствуют оксибензойные кислоты (галловая кислота), флаван-3 олы (катехин и эпикатехин), стильбеновые вещества (транс-ресвератрол и его производное – виниферин), олигомерные и полимерные проантоцианидины. Экспериментально установлены органолептические, физико-химические показатели экспериментального образца продукции из лозы винограда. Рекомендуемая доза приема экспериментального безалкогольного пищевого концентрата полифенолов лозы винограда, с учетом массовой концентрации в нем фенольных веществ, не менее $9,2 \text{ г/дм}^3$ и концентрации суммы стильбеновых веществ, составляет $0,20 \text{ мл/кг}$ веса человека, в сутки, с учетом адекватной суточной дозы потребления стильбенов количестве $0,03 \text{ г}$. Энергетическая ценность экспериментального образца БКЛВ составила 174 ккал (726 кДж).

Разработаны:

- стандарт организации СТО 01580301.036-2021. Концентрат полифенолов лозы винограда безалкогольный пищевой. Технические условия;
- технологическая инструкция по экспериментальному производству безалкогольного пищевого концентрата полифенолов из лозы винограда ТИ 01580301.005-2020.

7. Применение безалкогольного пищевого концентрата полифенолов лозы винограда (БКЛВ) на фоне моделирования МС, вызванного питанием 60% фруктозой, приводит к нормализации липидограммы и снижению уровня ОХС на $9,3 \%$ ($p < 0,05$), а ТГ – на $30,1 \%$ ($p < 0,001$) по сравнению с аналогичными показателями крыс МС без коррекции, оказывает гипогликемическое действие.

8. Экспериментальные образцы концентрированного спиртосодержащего пищевого экстракта выжимки винограда (ЭВВ) и безалкогольного пищевого концентрата полифенолов лозы винограда (БКЛВ) по микробиологической стабильности и показателям безопасности соответствуют требованиям технического регламента Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»

9. В ходе экспериментальных исследований определены основные параметры и режимы технологического процесса получения экспериментальных образцов продукции из виноградного сырья:

- технологический запас фенольных веществ в виноградном сырье (виноградная выжимка, семена, гребни, лоза, листья)
- массовая концентрация фенольных веществ в виноградном сырье;
- доля содержания влаги в виноградном сырье;
- степень измельчения виноградного сырья;
- концентрация этилового спирта в водно-спиртовом экстрагенте;
- соотношение масс виноградного сырья и водно-спиртового пищевого экстрагента при постановке на экстракцию настаиванием;
- время проведения экстракции;
- температурный режим экстракции настаиванием.
- концентрирование экстракта испарением этанола отгонкой под вакуумом при температуре 40-50 °С и остаточном давлении 0,1-0,2 атм до содержания этанола не более 0,5 % об.;
- стабилизация концентратов полифенолов из виноградного сырья путем пастеризации при температуре не выше 80 °С и купажирование с инвертированным сахарным сиропом.

10. Разработаны принципиальные технологические схемы:

- получения стабильного концентрированного спиртосодержащего пищевого экстракта полифенолов виноградной выжимки;
- получения стабильного безалкогольного пищевого концентрата полифенолов лозы винограда.

По материалам исследований

за период выполнения НИР 2021 года:

1. Опубликовано 2 статьи и принята 1 статья в научные журналы, индексируемые в базе данных Scopus.
2. Опубликовано 1 статья и 1 принята в печать в журналы, индексируемые в базе данных РИНЦ
3. Принято участие в 1-ой Всероссийской конференции и 3 х международных научно-практических конференциях.
4. В целях реализации технологического проекта «Разработка и трансфер технологий в рамках развития распределенного реабилитационного консорциума" программы деятельности межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня «МореАгроБиоТех» разработан проект создания новой молодежной лаборатории аналитических исследований, инновационных и ресурсосберегающих технологий ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН».
5. Заключен договор о научном сотрудничестве № 11/6-15/Б-16 с медицинской академией им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».
6. Заключен договор № 46/2021 от 26.02.2021 г. об оказании услуг «Исследование экстрактов растительного сырья методом ВЭЖХ, для применения в пищевой и косметической промышленности» на сумму 100 тыс. рублей. Сумма по договору № 46/2021 от 26.02.2021 г. получена в полном объеме.