

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт питания»

На правах рукописи

САРКИСЯН ВАРУЖАН АМБАРЦУМОВИЧ

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛЕНИЯ ПИЩЕВЫХ
МАСЛОЖИРОВЫХ ПРОДУКТОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ИХ
КОНТРОЛЯ

14.02.01 – Гигиена

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители: доктор биологических наук,
Бессонов В.В.
доктор технических наук,
Кочеткова А.А.

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
1 ВВЕДЕНИЕ.....	4
1.1 Актуальность темы.....	4
1.2 Научная новизна.....	6
1.3 Практическая значимость.....	7
1.4 Апробация работы.....	8
1.5 Публикации.....	9
1.6 Личный вклад соискателя.....	9
1.7 Объем и структура диссертации.....	9
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
2.1 Пути развития окислительных процессов в жировых продуктах.....	10
2.1.1 Автоокислительные процессы в маслах и жирах.....	10
2.1.2 Развитие процессов ферментативного окисления.....	13
2.1.3 Развитие окислительных процессов при термической обработке.....	17
2.2 Токсикологическая характеристика продуктов окисления масел и жиров.....	19
2.2.1 Токсикологическая характеристика продуктов гидролиза триглицеридов.....	19
2.2.2 Токсикологическая характеристика липидных пероксидов.....	21
2.2.3 Токсикологическая характеристика низкомолекулярных карбонильных соединений.....	22
2.2.4 Токсикологическая характеристика термически окисленных масел.....	26
2.3 Методы регулирования окислительных процессов.....	31
2.4 Нормативное регулирование в области контроля качества и безопасности масложировых продуктов.....	37
2.4.1 Нормативное регулирование в области контроля окислительной порчи масел, жиров и жировых продуктов.....	38
2.4.2 Нормативное регулирование процессов жарки во фритюре.....	39
2.5 Выводы.....	43
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	44
3.1 Характеристика используемых материалов и реактивов.....	44
3.1.1 Масла и жиры.....	44
3.1.2 Антиоксиданты.....	44
3.1.3 Модели липоксигеназы и лигандов.....	45
3.2 Методы определения гигиенических показателей жировых продуктов.....	46
3.3 Методы определения окислительной стабильности жировых продуктов.....	47
3.4 Методы инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье.....	48
3.5 Методы определения общих полярных веществ.....	48
3.6 Процедура жарки картофеля в лабораторных условиях.....	49
3.7 Процедура жарки картофеля в производственных условиях.....	50
3.8 Процедура исследований фермент-лигандных комплексов методом молекулярного докинга.....	50
3.9 Методы статистической обработки экспериментальных данных.....	51
4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	52
4.1 Разработка объектно-ориентированной базы данных химического состава растительных и животных масел и жиров.....	52

4.2 Анализ гигиенических показателей качества и безопасности при окислении дисперсных жировых продуктов	61
4.3 Разработка принципа дифференциальной оценки развития процессов перекисного окисления липидов	66
4.4 Анализ индикаторов для оценки гигиенических рисков при использовании фритюрных жиров.....	72
4.5 Разработка метода выполнения измерений общих полярных веществ во фритюрных жирах.....	95
4.6 Скрининговые исследования активности ингибиторов липоксигеназы-1 сои.....	98
4.7 Выявление взаимосвязи между структурой и способностью флавоноидов к ингибированию липоксигеназной активности	105
5 ВЫВОДЫ.....	109
6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111
7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	131

1 ВВЕДЕНИЕ

1.1 Актуальность темы

Масла, жиры и жировые продукты относятся к продуктам массового потребления, которые входят в повседневный рацион питания всех категорий населения, они являются источником эссенциальных пищевых веществ и при правильном выборе и потреблении играют важную роль в обеспечении здоровья населения (Кочеткова А.А. [1–4], Лисицын А.Н. [5–13], Shahidi F. [14–38]).

Анализ фактического питания россиян, проводимый на протяжении многих лет Научно-исследовательским институтом питания РАМН, показал, что одним из нарушений, касающихся жирового состава рациона, является употребление пищи, содержащей продукты окисления липидов [Тутельян В.А., Погожева А.В., Бессонов В.В. Суханов Б.П. 2006-2015,]. Существует три основных пути развития окислительных процессов в липидах, среди которых: автоокисление, термическое разложение и ферментативное окисление [Эмануэль Н.М. [39–49], Лисицын А.Н. [5–13], Andreou A. [50–52], Kanehisa M. [53,54], Billek J [55–59]).

Наиболее токсичными продуктами при автоокислении липидов являются 2-алкенали (акролеин, II класс опасности), 4-гидроксиалкенали (транс-4-гидрокси-2-нонеаль, II класс опасности) и малоновый альдегид (III класс опасности) (Esterbauer H [25,56,57,59–70]). При ферментативном окислении, а также при термической обработке масел и жиров образуется ряд других низкомолекулярных карбонильных соединений, среди которых: транс, транс-2,4-декадиеналь, транс-2-гексаналь, гептеналь и транс-цис-2,4-нонадиеналь (III класс опасности) [71–75].

При постоянном потреблении продуктов окисления липидов с пищей данные соединения способны проявлять общетоксическое (нарушение функции печени и почек, снижение массы тела, развитие окислительного

стресса, атеросклероз), иммунотоксическое (повреждение лимфоцитов тимуса) и тератогенное (повышение материнской смертности и частоты выкидышей) действие в зависимости от типа соединений и их концентрации [76–79][62][80,81].

Принимая во внимание тот факт, что жировые продукты составляют до 36% от калорийности суточного рациона, вклад токсичных соединений, присутствующих в них, значительно повышает риски развития алиментарно-зависимых заболеваний. В связи с этим современные технологии жировых продуктов предусматривают введение в их состав различных антиоксидантов.

При этом, единственными гигиеническими показателями безопасности, характеризующими окислительные процессы, остаются перекисное и кислотное числа, несмотря на то, что ни пероксиды липидов, ни свободные жирные кислоты не оказывают токсического действия на организм при потреблении с пищей.

В соответствии с действующим Техническим Регламентом, значение перекисного числа не должно превышать 10 мэкв[О]/кг, а кислотного числа – 0,6 мг КОН/г с небольшими вариациями для нерафинированных масел и оливкового масла.

Определение данных гигиенических показателей осуществляется титриметрическими методами, при этом точность измерений в значительной степени зависит от чистоты используемых реактивов и присутствия следов воды в образце, в связи с чем требуется экстракция жировой фазы (в случае дисперсных жировых продуктов), что в, известной степени, влияет на изначальное содержание продуктов окисления.

В ряде технологических процессов, получивших широкое распространение относительно недавно, не представляется возможным использование перекисного и кислотного чисел в качестве контрольных. Одним из наиболее ярких примеров процесса, в котором применение показателя перекисного числа неадекватно, является жарка пищевых

продуктов, при которой температура масла достигает 180 °С, что значительно выше температуры разрушения перекисных соединений (120 °С). При этом, в действующих нормативных документах (СанПиН 2.3.6.1079-01) нет указаний на альтернативные методы измерений.

Регулирование процессов ферментативного окисления липидов играет большую роль при контроле образования продуктов перекисного окисления в нерафинированных маслах и масличном сырье в силу высокой специфичности и скорости протекания реакции, на порядок превышающей скорость протекания неферментативного перекисного окисления [Repetto M., 2012]. Наибольшее разнообразие продуктов ферментативного окисления при этом образуется посредством липоксигеназного пути окисления [Иванов И.В., 2014].

1.2 Научная новизна

- 1 На основе обобщения сведений о химическом составе масел и жиров высших наземных растений впервые выявлена взаимосвязь между жирнокислотным составом масел и содержанием компонентов их системы антиоксидантной защиты.
- 2 Впервые методом ИК-спектроскопии с преобразованиями Фурье установлено соответствие динамики накопления продуктов окисления липидов при нормальных условиях динамике этого процесса при избытке кислорода, что обусловило применимость моделей с избытком кислорода для описания окислительных процессов в дисперсных жировых продуктах.
- 3 Впервые предложен принцип дифференциальной оценки степени развития процессов перекисного окисления липидов в условиях *in situ* без предварительной экстракции липидов из объекта исследования.
- 4 Впервые в России внедрены критерии гигиенической оценки показателей качества и безопасности фритюрных жиров: показатель преломления и содержание общих полярных веществ.

- 5 Установлена и количественно охарактеризована взаимосвязь между структурой флавоноидов различных классов и их способностью к ингибированию липоксигеназы-1 сои.
- 6 Раздел фундаментальных исследований по изучению ингибиторов липоксигеназы сои выполнен в рамках гранта РФ (Проект № 14-36-00041).
- 7 Разработка специализированного липидного модуля выполнена в рамках гранта РФ (Проект « 14-16-00055).

1.3 Практическая значимость

Разработана база данных химического состава масел и жиров высших наземных растений, животных и гидробионтов, включая микроводоросли (Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2015620490), которая позволяет проводить расчет состава многокомпонентных жировых продуктов и на основании статистической информации подбирать оптимальные сочетания натуральных антиоксидантов для регулирования окислительных процессов в маслах, жирах и эмульсионных продуктах.

С использованием сведений по химическому составу масел и жиров, обобщенных в зарегистрированной базе данных, разработаны функциональные пищевые продукты эмульсионного типа сбалансированного жирнокислотного состава с природными антиоксидантами, предназначенные для профилактики и диетотерапии алиментарнозависимых заболеваний (растительно-жировой спред функционального назначения и специализированный липидный модуль). Результаты разработок внедрены в производственную практику (акт внедрения научно-исследовательских и технологических работ от 07.10.2013), и оформлены в виде РИД (Заявка на патент РФ на изобретение «Специализированный липидный модуль» рег. № 2014148929 от 05.12.2014).

Разработана методика выполнения измерений содержания общих полярных веществ во фритюрных жирах методом контактного измерения

диэлектрической постоянной масла с валидацией по стандартному методу определения содержания общих полярных веществ методом колоночной хроматографии.

Результаты проведенных исследований по определению качества фритюрных жиров использованы при разработке ГОСТ Р 54607.3-2014 «Услуги общественного питания. Методы лабораторного контроля продукции общественного питания. Часть 3. Методы контроля соблюдения процессов изготовления продукции общественного питания», введение которого будет способствовать возможности осуществления надлежащего контроля качества и безопасности продукции общественного питания.

Методика выполнения измерений апробирована на 5 предприятиях системы общественного питания в городе Москве.

1.4 Апробация работы

Диссертация апробирована на межлабораторной научной конференции ФГБНУ «НИИ питания» 16 июня 2015 года, на заседании диссертационного совета ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» 17 июня 2015 года.

Результаты исследования доложены и обсуждены на XIV Всероссийском Конгрессе диетологов и нутрициологов с международным участием «Питание и здоровье» Алиментарно-зависимая патология: предиктивный подход» (Москва, 2013), XV Всероссийском конгрессе диетологов и нутрициологов с международным участием «Здоровое питание: от фундаментальных исследований к инновационным технологиям» Москва, 2014), VIII Международной научно-практической конференции «Перспективы развития научных исследований в 21 веке» (Махачкала, 2015), международной конференции 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (Стамбул, 2014), Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2014, 2015).

1.5 Публикации

По результатам исследований опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 – в изданиях, рекомендованных ВАК; подана 1 заявка на патент РФ на изобретение, получено 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных.

1.6 Личный вклад соискателя

При планировании, организации и проведении исследований по всем разделам работы доля личного участия соискателя составила не менее 90%. Анализ фактического материала и обобщение результатов полностью проведены автором диссертационной работы.

1.7 Объем и структура диссертации

Работа изложена на 197 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц, 31 рисунок. Состоит из введения, аналитического обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследований, 7 глав собственных исследований, выводов, библиографии, 6 приложений. Библиография включает 235 источников, в том числе 30 на русском языке и 205 на иностранном.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Пути развития окислительных процессов в маслах и жирах

Под понятием окисление липидов подразумевают два, во многом различных, процесса: с одной стороны, под окислением липидов понимают самопроизвольное, автокаталитическое, неспецифическое изменение структуры липидов (автоокисление), протекающее в изолированных липидах, а с другой стороны – ферментативное изменение липидов, протекающее в биологических системах. Данные процессы отличаются условиями и кинетикой протекания реакций, а также образующимися продуктами окисления и их биологическому действию. Общим для обоих процессов является их необратимость [40–44,82].

Оба типа окислительных процессов частично пересекаются в жировых пищевых продуктах при экстракции липидов из масличного сырья, сопровождающейся нарушением его целостности и резким увеличением концентрации кислорода [39,48].

Дальнейшее использование пищевых масел и жиров в некоторых случаях (например, при обжаривании пищевых продуктов) сопровождается высокотемпературной обработкой, в результате которой начинают протекать окислительные процессы, невозможные при нормальных условиях, с образованием специфичных продуктов окисления.

Понимание механизмов протекания процессов окисления липидов, а также природы образующихся продуктов окисления в разных липидных системах является необходимым условием для адекватной оценки, контроля и регулирования безопасности жировых пищевых продуктов.

2.1.1 Автоокислительные процессы в маслах и жирах

Развитие автоокислительных процессов приводит к появлению в жирах и жиросодержащих продуктах соединений перекисного характера, альдегидов,

кетонов, низкомолекулярных кислот, оксикислот и других соединений [44,49].

Процесс окисления липидов, в классическом представлении, идет по свободнорадикальному, цепному, автокаталитическому механизму, который обычно разделяют на три этапа: инициирование, разветвление и обрыв цепей (рис. 1).

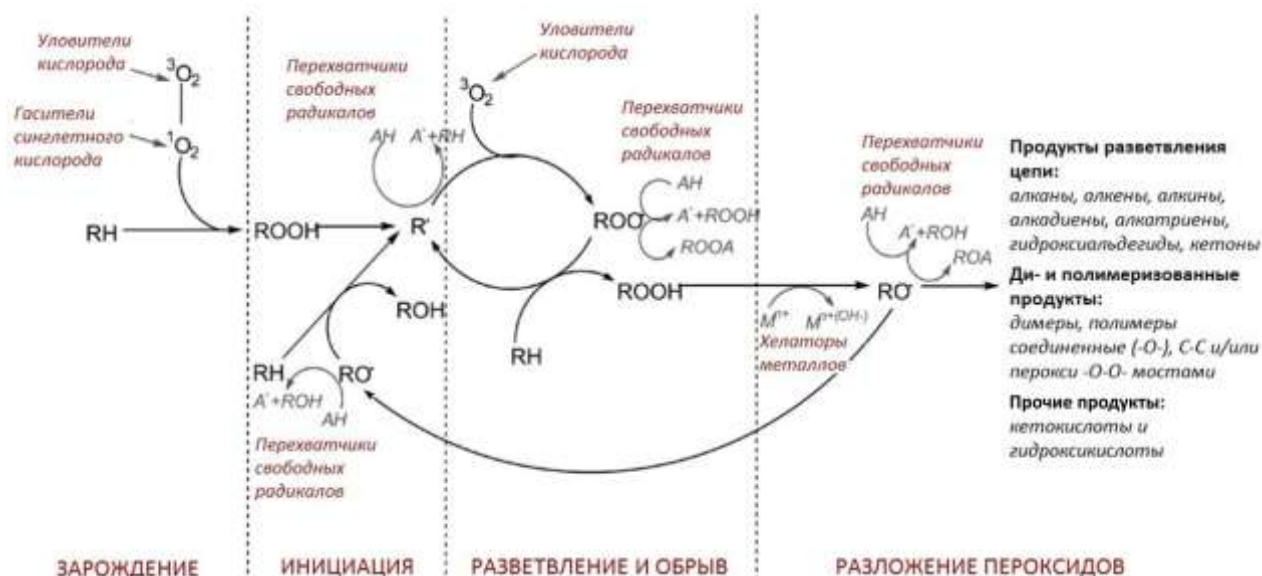


Рисунок 1 – Общая схема развития автоокислительных процессов в липидных системах и возможные пути воздействия антиоксидантов на процессы окисления липидов [14]

Согласно классификации Ю.А. Владимирова [64], выделяется три разновидности радикалов. Первичные радикалы (супероксид анион-радикал, радикалы убихинонов и оксида азота) имеют специфические ферментативные пути генерации. Вторичные радикалы (гидроксильный, пероксильный, алкоксильный и др.) образуются неферментативным путем из первичных и обладают наибольшей химической активностью. Третичные радикалы являются продуктами взаимодействия первичных и вторичных радикалов между собой или с антиоксидантами и, как правило, имеют низкую реакционную способность.

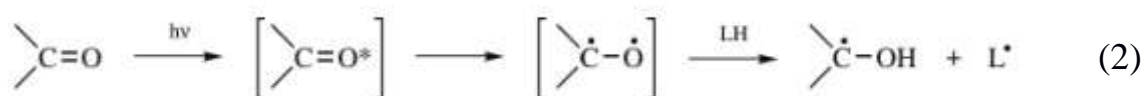
На этапе инициирования, в результате взаимодействия синглетной формы кислорода с жирными кислотами, генерируется карборадикал (R^{\bullet}). Развитие цепи включает образование пероксильного радикала (ROO^{\bullet}), взаимодействующего со следующей молекулой жирной кислоты. Обрыв цепи происходит в результате образования третичных радикалов (например, радикалов антиоксидантов, A^{\bullet} , AOO^{\bullet}), или же в результате полимеризации (сополимеризации) вторичных радикалов.

Окисление липидов может быть иницировано различными факторами [83], в том числе воздействием света, наличием ионов поливалентных металлов, высокой температурой, присутствием активного кислорода, высоким содержанием ацилов ненасыщенных жирных кислот в составе липидов и прочими видами воздействия.

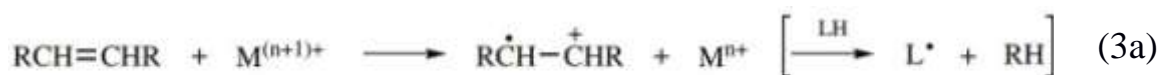
Ультрафиолетовое (УФ) излучение, в основном, оказывает влияние на двойные связи липидов, пероксидные (O–O) связи, а также на карбонильные соединения. Действие УФ-излучения на первичные продукты окисления липидов является косвенным и представляет собой гомолитическое расщепление перекисных соединений ($HOOH$, $ROOH$), приводящее к образованию RO^{\bullet} - и HO^{\bullet} -радикалов – истинных инициаторов окисления липидов (реакции 1а-в) [84].



К вторичным продуктам окисления липидов, на которые оказывает влияние УФ- излучение, относятся карбонильные соединения, реакция которых приводит к образованию карборадикалов (реакция 2) [85].



Поливалентные металлы (железо, кобальт, медь, магний, марганец и ванадий) оказывают сильное прооксидантное действие, находясь как в нативной форме (в составе активных центров ферментов), так и будучи введенными в продукт с целью его обогащения минеральными веществами [86]. Отличительной особенностью катализа перекисного окисления липидов, обусловленного поливалентными металлами, является то, что они могут вступать в цепь окисления липидов как на этапе инициирования (реакция 3а), так и на этапе пролонгирования (реакция 3б) цепи [87], что обуславливает заметное ускорение окислительных процессов даже при наличии поливалентных металлов в следовых количествах.



Повышение температуры при технологической обработке или хранении жиров также интенсифицирует перекисное окисление липидов, что чаще всего связывают с ускорением реакции разложения перекисей до перекисных ROO^{\bullet} и алкоксильных RO^{\bullet} радикалов. Причем увеличение температуры на каждые 10°C приводит к ускорению реакции в два раза [88].

2.1.2 Развитие процессов ферментативного окисления

Развитие ферментативного окисления липидов – сложный биохимический процесс, в который вовлечено большое число ферментов: липоксигеназы, дивинилэфирсинтазы, гидропероксидлиазы, алленоксидсинтазы и другие [73,89–93]. Развитие процессов ферментативного окисления липидов приводит к образованию веществ различной химической природы, объединенных общим названием оксилипины [94].

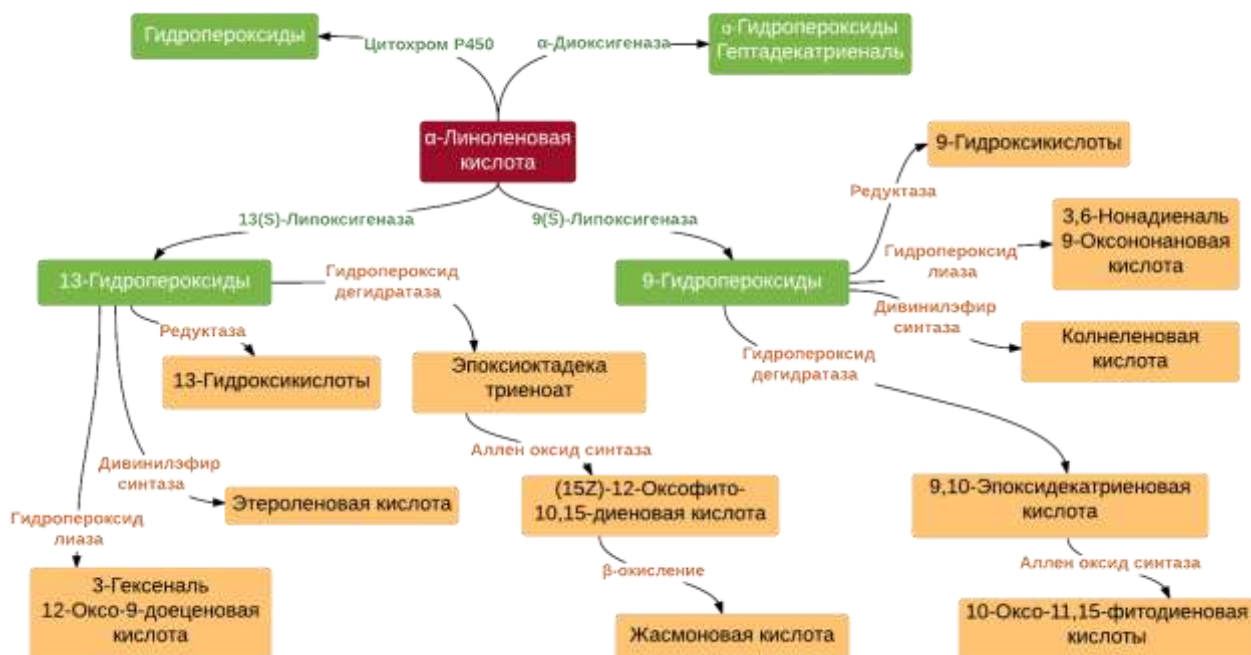


Рисунок 2 – Пути ферментативного окисления α -линоленовой кислоты [53,54]

Оксилипины в масличных растениях образуются в процессе метаболизма ненасыщенных жирных кислот путем присоединения атомов кислорода, катализируемого цитохромом P450, α -диоксигеназой или липоксигеназами (Рис. 2). Биологическая роль оксилипинов до конца не изучена, однако, опубликованные результаты многочисленных исследований свидетельствуют об участии оксилипинов в механизмах защиты растений от механических повреждений животными и насекомыми, стресса и атак патогенов [50,94–101].

Основными жирными кислотами, включающимися в указанные метаболические пути у растений являются α -линоленовая (C 18:3), линолевая (C 18:2) и гексадекатриеновая (C 16:3) полиненасыщенные жирные кислоты [52].

Цитохром P450-зависимое окисление жирных кислот протекает посредством последовательного или ω -гидроксилирования насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Принято считать, что ферменты,

участвующие в данном процессе (CYP94A1 и CYP86A8), служат для предохранения от потенциальной токсичности избыточного накопления свободных жирных кислот под действием липазы [102].

Окисление жирных кислот при участии α -диоксигеназы происходит с образованием α -гидрокси жирных кислот, после которого следует их самопроизвольное декарбоксилирование до полиненасыщенных высших альдегидов [103]. Данные метаболиты предположительно участвуют в механизмах защиты организма от действия патогенов [104].

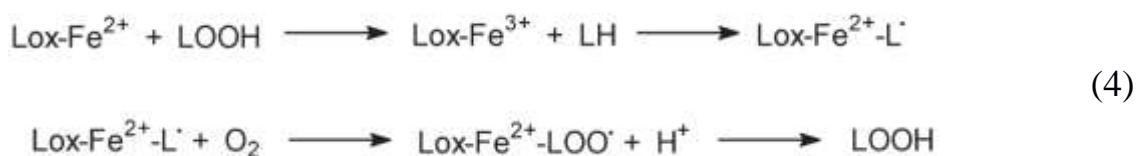
Наибольшее разнообразие продуктов ферментативного окисления образуется при липоксигеназном пути окисления. Название данного пути связано с тем, что инициирование разветвленной цепи синтеза метаболитов происходит при участии 9(S)-или 13(S)-липоксигеназ (LOX), под действием которых образуются стереоспецифические 9- или 13-пероксиды жирных кислот [51].

Перекисные соединения, образовавшиеся под действием LOX, далее могут выступать в качестве субстрата для многих ферментов, в том числе, повторно для липоксигеназ с образованием кетодиенов, при условии низкой концентрации кислорода [105]. Также 9- и 13-пероксиды жирных кислот являются субстратом для гидропероксидлиаз, под действием которых пероксиды разрушаются до ненасыщенных альдегидов и оксикислот [106], дивинилэфирсинтазы – с образованием эфирных жирных кислот [107], редуктаз – с образованием гидроксикислот, гидропероксиддегидратаз и алленоксидсинтаз – с образованием циклопентениловых жирных кислот [108].

Таким образом – липоксигеназы являются ключевыми ферментами, дающими начало развитию множества окислительных реакций в растениях.

Липоксигеназы содержат атом железа в активном центре, благодаря чему способны участвовать в окислительно-восстановительных реакциях перекисного окисления липидов. Активация LOX происходит при взаимодействии с перекисными соединениями из субстрата с окислением

неактивного Fe^{2+} до активной формы Fe^{3+} (уравнение 4). После активации, липоксигеназа может связываться с жирными кислотами с образованием комплекса «LOX- алкильный радикал жирной кислоты», который под действием кислорода превращается в «LOX- пероксидный радикал жирной кислоты» с дальнейшим отщеплением гидропероксида жирной кислоты и восстановлением Fe^{3+} до Fe^{2+} [51,109].



Липоксигеназы активны в широком диапазоне pH от 6,5 до 9 [110–112]. Скорость реакции LOX со свободной линолевой кислотой (C 18:2) больше, чем скорость с ее эфиром и больше, чем с ее триглицеридом. Скорость ферментативного окисления в 10^7 раз выше скорости автоокисления [113].

Липоксигеназная активность имеет большое значение в технологии получения масел из растительного сырья в силу того, что под действием данных ферментов образуются токсичные низкомолекулярные альдегиды и кетоны (табл. 1) [113,114].

Таблица 1 – Основные вторичные продукты окисления липидов, образуемые липоксигеназами [114]

Липоксигеназа	Субстрат	Вторичные продукты
LOX-1 сои	18:2 ω-6	гексаналь, т-2,т-4-декадиеналь
	18:3 ω-3	т-2-гексеналь, пропаналь, пентаналь
LOX-2 сои	18:2 ω-6	гексаналь, т-2,т-4-декадиеналь, т-2,ц-4-декадиеналь, т-2-гексеналь, т-2-октеналь
	18:3 ω-3	пропаналь, т-2,ц-4-гептадиеналь, т-2-пентаналь,т-2-гексеналь, 2,4,6-нонатриеналь, 3,5-октадиен-2-он
LOX гороха	18:2 ω-6	гексаналь, 2,4-декадиеналь, 2-гептаналь, 2-октеналь, пентаналь, 2,4-нонадиеналь
	18:3 ω-3	т-2,ц-4-гептадиеналь, пропаналь, 2-пентаналь, ацетальдегид, кротоновый альдегид, 2-гексеналь
LOX картофеля	18:3 ω-3	2,6-нонадиеналь, 2-гексеналь, пропаналь, 3,5-октадиен-2-он, 2,4-гептадиеналь
LOX бобовых	18:3 ω-3	2-гексеналь, пропаналь, 2,4-гептадиеналь
LOX арахиса	18:2 ω-6	пентаналь, гексаналь

т – транс, ц – цис

Присутствие специфических для различных видов липоксигеназ продуктов окисления липидов обуславливает наличие специфических постороннего вкуса и запаха в нерафинированных маслах, в связи с чем, масличное сырье в большинстве случаев подвергают предварительной термической обработке для ингибирования ферментативной активности [115].

Однако, некоторые методы получения масел, в частности, получение масел методом холодного отжима, исключает подобную обработку, в результате чего ферменты, входящие в состав масличного сырья, остаются активными и в масле.

2.1.3 Развитие окислительных процессов при термической обработке

До начала термической обработки масла и жиры, используемые для жарки, состоят преимущественно (до 99%) из смеси триглицеридов различных жирных кислот. В процессе жарки, который обычно проводят при высоких температурах (порядка 160–180 °С), начинают протекать процессы, существенно изменяющие исходный химический состав липидов.

Под действием высоких температур, кислорода и влаги, поступающей вместе с обжариваемым продуктом, в маслах начинают протекать процессы гидролитической, окислительной и термической порчи, приводящие к образованию токсичных химических соединений, таких как альдегиды, кетоны, спирты, циклические соединения, ди- и полимеры [71].

Stevenson с соавторами [72] и Gutierrez с соавторами [75] провели исследования основных химических соединений, образующихся в процессе жарки, и описали основные механизмы их образования. В рамках данной работы их результаты резюмированы.

Гидролитические процессы во время жарки провоцирует влага, присутствующая в обжариваемом продукте, которая при температуре жарки

в состоянии пара реагирует с триглицеридами с образованием свободных жирных кислот, моно- и диглицеридов, а также глицерина.

Продукты окислительной порчи можно условно разделить на три группы: к первой группе относятся вещества, образующиеся в результате расщепления – спирты, альдегиды, кислоты и углеводороды; ко второй группе относятся вещества, образующиеся в результате дегидрирования – кетоны; к третьей группе относятся вещества, образующиеся в результате свободно-радикального окисления – окисленные формы моно-, ди-, три- и полимеров, эпоксиды, спирты, углеводороды, неполярные ди- и полимеры.

Наибольшее количество продуктов окислительной порчи образуется в результате свободно-радикального окисления, имеющего цепной механизм реакции [20].

Термическая порча жиров происходит при высоких температурах с образованием циклических моно-, ди- и полимеров в результате реакций полимеризации [116]. Крупные молекулы полимеров образуются при помощи углерод-углеродных или углерод-кислород-углеродных мостиков между жирными кислотами или другими продуктами термической порчи. Наибольшее содержание полимеризованных соединений образуется в маслах с высоким содержанием линоленовой кислоты (C18:3).

Неполярная фракция фритюрных жиров состоит преимущественно из триглицеридов, не подвергнувшихся изменениям, а также незначительных количеств неполярных ди- и тримеров [117].

Все остальные продукты окисления объединены в общую группу полярных соединений, также называемую «общие полярные вещества». К полярным веществам относят моно- и диглицериды жирных кислот, свободные жирные кислоты, циклические мономеры и летучие соединения.

2.2 Токсикологическая характеристика продуктов окисления масел и жиров

В результате развития окислительных процессов масла и жиры теряют свою пищевую ценность, и, в общем, при хроническом воздействии индуцируют

развитие окислительного стресса – состояние организма, при котором наблюдается нарушение баланса между образованием активных форм кислорода и работой системы антиоксидантной защиты. Этот процесс подразумевает избыточное внутриклеточное накопление свободных радикалов, активацию процессов и накопление продуктов перекисного окисления липидов, как универсальную форму ответа организма на воздействие неблагоприятных экзогенных факторов.

Большинство опубликованных токсикологических исследований в области воздействия продуктов окисления липидов на функции организма посвящено изучению продуктов окисления липидов, образующихся непосредственно в организме, и лишь малая часть – вопросу влияния на организм продуктов окисления, поступающих с пищей. При этом стоит отметить, что эксперименты, проведенные на людях, составляют малую долю от общего объема исследований [25].

2.2.1 Токсикологическая характеристика продуктов гидролиза триглицеридов

Продукты, образующиеся при гидролизе липидов, в некоторых случаях ошибочно относят к продуктам вторичного окисления [118]. Однако продукты гидролиза липидов в пищевых продуктах, являясь идентичными продуктам гидролиза в организме человека, в целом, не обладают токсическим действием на организм.

Токсичность продуктов гидролиза соответствует токсичности негидролизированных липидов и в большей степени зависит от сбалансированности жирнокислотного состава триглицеридов. Результаты некоторых наиболее полных токсикологических исследований избытка жирных кислот в рационе питания приведены в таблице 2.

Как видно из данных таблицы 2, существует большое число исследований, показывающих, существенную токсичность избыточного потребления отдельных жирных кислот с пищей в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. В первую очередь, характерным как для короткоцепочечных, так и для

Таблица 2 – Токсикологическая характеристика некоторых продуктов гидролиза масел и жиров

Наименование	Токсикокинетика	Острая пероральная токсичность	Нейротоксичность	Иммунотоксичность	Репродуктивная/эмбриотоксичность	Канцерогенность	Сенсибилизация и аллергенность	Источник
Арахидоновая кислота	Всасывается в желудочно-кишечном тракте, подвергается β-окислению	×	—	↑АФК в нейтрофилах	×	Неопластична в почках, мочевом пузыре	×	[74,119–121]
Линолевая	Практически полностью всасывается и накапливается в адипоцитах, метаболизируется в арахидоновую кислоту	LD _{50M} : 50г/кг	↓ ТРП V1, M8 Корреляция с поведением типа а	↑ синтез PG-E2, высвобождение цитозольного Ca и гистамина, ↓ иммунитета у мышей и людей, рост лимфоцитов, синтез IL-2	↑ секреции прогестерона в зернистых клетках яичника	↑ риски развития рака груди, поджелудочной железы	↑Секреции IgE	[122–135]
Лауриновая кислота	Транспортируется в портальную и лимфатическую системы хиломикронами, подвергается ω-затем β-окислению	LD _{50K} : 12г/кг LOAEL: 4.64г/кг	↑ роста аксонов в линии клеток PC12	↑ экспрессии костимулирующих факторов ↑ Толл-подобн. рецепторов ↑АФК в нейтрофилах	—	↓5α-редуктазы ↓ роста клеток линии HT-29	—	[119] [136–141]

LD_{50M} – полулетальная доза для мышей, LD_{50K} – полулетальная доза для крыс, «×» – нет сведений, «—» – отсутствие эффекта, «↑» – повышение/активация, «↓» – снижение/ингибирование, PGE2 – простагландин-2, IL-2 – интерлейкин-2, ТРП – транзиторный рецепторный потенциал, LOAEL – самый низкий уровень, при котором проявляется негативный эффект, АФК – активные формы кислорода.

Длинноцепочечных жирных кислот является иммунотоксичность, проявляющаяся в изменении в форменных элементах крови с повышением содержания в них активных форм кислорода.

Немаловажным является выраженное канцерогенное действие избытка полиненасыщенных жирных кислот семейства ω -6 (линолевая, арахидоновая), связанное с повышением рисков развития раковых заболеваний.

Стоит отметить, что полиненасыщенные жирные кислоты являются эссенциальными компонентами питания и при их сбалансированном потреблении как в свободном виде, так и в составе триглицеридов в физиологически необходимых количествах, вышеописанные токсические свойства не проявляются.

2.2.2 Токсикологическая характеристика липидных пероксидов

Соединения перекисной природы образуются на первой стадии окисления липидов – гидропероксиды трилицеридов, которые напрямую или посредством сопутствующих радикальных реакций способны разрушать витамин Е в мембранах клеток. В свою очередь, снижение уровня витамина Е может привести к развитию окислительного стресса [142].

В экспериментах *in vivo* показана высокая токсичность пероксидов липидов, в частности, Korhonen с соавторами показана эмбриотоксичность пероксидов жирных кислот в эксперименте с трехдневными куриными эмбрионами; Cortesi и Privett в эксперименте по внутривенному введению пероксидов липидов самцам крыс установлена летальная доза (LD) для данных соединений, составляющая 0,07 ммоль/100г массы тела, при этом смерть наступала в результате отека легких; Bull и соавторы [143] показали канцерогенное действие пероксидов олеиновой и арахидоновой кислот при интаректальном введении крысам.

Однако пероральное введение пероксидов липидов животным в остром и хроническом экспериментах не оказывало существенного токсического

действия [57]. Низкая токсичность пероксидов триглицеридов при оральном введении, по-видимому, объясняется их низкой адсорбцией в организме, низкая токсичность гидропероксидов жирных кислот – с их разрушением глутатионпероксидазой до менее токсичных гидроксикислот [56].

Среди исследований, выявивших негативный эффект от внесения пероксидов липидов в рацион лабораторных животных, можно привести работу Oarada и соавторов [67]. В данной работе было показано что при введении в рацион мышей 190 мг/22г массы тела пероксида метиллинолеата с перекисным числом, равным 6100 мэкв/кг (что на порядки превышает реальное потребление перекисных продуктов с пищей) развивается некроз лимфоцитов в тимусе, снижение массы тимуса, а также повышение значения тиобарбитурового числа в печени, тимусе и крови.

2.2.3 Токсикологическая характеристика низкомолекулярных карбонильных соединений

Среди вторичных продуктов окисления, образующихся при автоокислении липидов, значительной активностью обладают низкомолекулярные альдегиды, наиболее изученными из которых являются 2-алкенали, 4-гидроксиалкенали и малоновый диальдегид [25]. Краткая токсикологическая характеристика данных соединений приведена в таблице 3.

Таблица 3 – Токсикологическая характеристика основных альдегидов, образующихся в процессе автоокисления липидов

Вещество	Токсикокинетика	Токсическое действие	Источник
2-Алкенали (акролеин)	<p>Экскретируется в течение 24 ч,</p> <p>Метаболический путь:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Конъюгирование с глутатионом 2. Гидролиз и окисление 3. Присоединение глутатиона по двойной связи акролеина <p>Метаболиты: щавелевая и малоновая кислоты, N-ацетил-S-2-карбоксит-</p>	<p>LD₅₀к: 7-46 мг/кг м.т.</p> <p>Общая токсичность: повышение содержания аддуктов белка и ДНК, снижение уровня глутатиона, развитие окислительного стресса.</p> <p>Репродуктивная токсичность: повышение материнской смертности частоты выкидышей при 4-6 мг/кг м.т./день у кроликов.</p> <p>Генотоксичность: не выявлена</p>	[65,79,144–151]

	гидроксиэтилцистеин и другие	Канцерогенность: не выявлена Класс опасности: II	
4-Гидрокси-алкенали (транс-4-гидрокси-2-нонеаль)	Экскретируется в течение 24 ч Метаболический путь: 1. Конъюгирование с глутатион трансферазой, альдегиддегидрогеназой и алкогольдегидрогеназой 2. Метаболизация до меркаптуровой кислоты Метаболиты: Выведение с мочой и в виде CO ₂	LD_{50M}: 68,6 мг/кг м.т. Общая токсичность: ингибирование катаболизма (митохондриальное дыхание) и анаболизма (синтез ДНК и белка), что приводит к смерти клетки (некроз почек и печени). Иммунотоксичность: некроз лимфоцитов тимуса Генотоксичность: снижение частоты СХО Класс опасности: II	[29,36, 50–54]
Малоновый диальдегид	Экскретируется в течение 12 ч Метаболический путь: 1. Трансформация до малоновой кислоты альдегиддегидрогеназой 2. Декарбоксилирование до ацетальдегида 3. Окисление до конечных метаболитов CO ₂ и H ₂ O Метаболиты: N-ε-(2-пропеналь)лизин	LD_{50K}: 632 мг/кг м.т. Общая токсичность: В концентрациях 2 – 500 мкг/кг м.т. дозозависимое изменение ядер клеток печени (анизокариоз, гиперхромия, везикуляция), при наивысшей дозе – потеря веса, с атрофией экзокринных клеток поджелудочной железы. Генотоксичность: не выявлена Канцерогенность: не выявлена Класс опасности: III	[63,70,152–160]

LD_{50K} – полулетальная доза для крыс, **LD_{50M}** – полулетальная доза для мышей, СХО – сестринские хроматидные обмены

Наибольшим токсическим действием, среди изученных альдегидов, при пероральном введении обладает акролеин, с полулетальной дозой в опытах с крысами равной 7-46 мг/кг массы тела. Конъюгируясь с глутатион-S-трансферазой оказывает общетоксическое действие, выражающееся в повышении аддуктов белка и ДНК и снижении уровня глутатион-S-трансферазы. Кроме этого, акролеин проявляет токсическое действие по отношению к репродуктивной системе, выраженное в повышении материнской смертности и частоты выкидышей у млекопитающих.

Аналогичным образом метаболизируется транс-4-гидрокси-2-нонеаль, ингибирующий процессы дыхания в митохондриях, синтеза ДНК и белка, что приводит к некрозу клеток печени и почек. Кроме этого, в отличие от акролеина, транс-4-гидрокси-2-нонеаль обладает иммунотоксическим и генотоксическим действием, вызывая некроз лимфоцитов тимуса, а также

снижая частоту сестринских хроматидных обменов. Полулетальная доза в экспериментах с мышами для транс-4-гидрокси-2-нонеаля составляет 68,6 мг/кг массы тела.

Малоновый диальдегид, в отличие от акролеина и транс-4-гидрокси-2-нонеаля, экскретируется из организма уже спустя 12 часов, метаболизируясь до малоновой кислоты под действием альдегиддегидрогеназы с последующим декарбоксилированием до ацетальдегида. Токсическое действие малонового диальдегида в большей степени проявляется в клетках печени и поджелудочной железы. Малоновый диальдегид обладает относительно высокой полулетальной дозой, равной 632 мг/кг массы тела в экспериментах с крысами.

При ферментативном окислении, а также при термической обработке масел образуется ряд других низкомолекулярных карбонильных соединений, среди которых: транс,транс-2,4-декадиеналь, транс-2-гексаналь, гептеналь, транс-цис-2,4-нонадиеналь и другие.

Токсикологическая характеристика данных летучих карбонильных соединений приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Токсикологическая характеристика основных летучих карбонильных соединений масел и жиров

Вещество	Основные результаты	Источник
Транс,транс-2,4-декадиеналь	NOAEL: 100мг/кг (мыши и крысы, внутрижелудочно) Общая токсичность: синтез АФК, снижение массы тела, Иммунотоксичность: повышение экспрессии цитокинов TNF- α и IL-1 β в клетках линии BEAS-2B Генотоксичность: не выявлена Канцерогенность: образование аддуктов ДНК, снижение соотношения GSH/GSSG	[161–168]
Транс-2-гексаналь	LD₅₀ (крысы): 780-1130 мг/кг м.т. LD₅₀ (мыши): 1550-1750 мг/кг м.т. NOAEL: 80мг/кг/день Общая токсичность: апоптоз кардиомиоцитов (цитохром-с опосредованно) Генотоксичность: увеличение числа	[77,78,169–175]

	микроядер в слущивающихся клетках слизистой щеки человека (4 дня) Канцерогенность: образование аддуктов ДНК, снижение соотношения GSH/GSSG Мутагенность: выраженная дозозависимая мутагенность в <i>S. Typhirnurium</i> Класс опасности: III	
Транс-2-пентеналь	Мутагенность: выраженная дозозависимая мутагенность в <i>S. typhirnurium</i>	[76]
2,4-Гексадиеналь	Канцерогенность: снижение соотношения GSH/GSSG, повышение содержания аддуктов ДНК при дозировке 90 мг/кг, гиперплазия преджелудка (3 мес), неоплазия преджелудка (2 года)	[76,161]
Транс-2-гептеналь	Мутагенность: выраженная дозозависимая мутагенность в <i>S. typhirnurium</i>	[76]
Транс-цис-2,4-нонадиеналь	Мутагенность: выраженная дозозависимая мутагенность в <i>S. typhirnurium</i>	[76][176]
Транс-2-деценаль	Мутагенность: выраженная дозозависимая мутагенность в <i>S. typhirnurium</i>	[176]

Несмотря на разную степень изученности токсикологических характеристик различных летучих альдегидов, можно выделить общие закономерности токсического действия. Большинство альдегидов являются гомологами, что обуславливает схожесть их влияния на организм. Среди наиболее распространенных эффектов можно выделить мутагенность, канцерогенность.

Для транс-транс-2,4-декадиенала в модели *in vitro* отмечена иммунотоксичность, при отсутствии статистически значимого генотоксического действия.

Транс-2-гексеналь, в дополнение к генотоксичности, обладает выраженным цитохром-с опосредованным кардиотоксическим действием в субхроническом эксперименте *in vivo*.

Важным является тот факт, что токсичность данных веществ проявляется независимо от способа введения (перитонеально, перорально, внутрижелудочно или при вдыхании), в связи с их локальным действием с контактирующими тканями.

Описанные токсикологические свойства характеризуют летучие карбонильные соединения как наиболее токсичные среди продуктов окисления липидов.

2.2.4 Токсикологическая характеристика термически окисленных масел

Значительный объем исследований в данной области был проведен Немецкой Ассоциацией по Изучению Жиров (DGF) в период с 1973 по 1979 г., в результате которых стало общеизвестным негативное влияние продуктов порчи жиров на здоровье человека вследствие их способности к разрушению витаминов, ингибированию ферментов, потенциальной мутагенности и раздражению кишечника [177].

Среди продуктов окисления, образующихся при термическом окислении липидов, особенное внимание необходимо уделить мономерам циклических жирных кислот, обладающих высокой токсичностью, которые образуются преимущественно из C18:3 и C18:2 жирных кислот. Высокая токсичность циклических жирных кислот связана, в первую очередь, с их высокой степенью адсорбции в организме (91% – 96% по массе), в результате чего они активно накапливаются в жировой ткани человека вместе с обычными жирными кислотами [178]. В отличие от перекисных соединений липидов, включение циклических жирных кислот в рацион лабораторных животных приводило к существенным метаболическим изменениям в частности: подавление координированной регуляции между активностью липогенных ферментов ($\Delta 9$ -десатураза, фосфатид-фосфогидролаза) и окислительным статусом в пероксисом, повышение уровня арахидоновой кислоты, снижение уровня гликогена в печени, снижение массы тела и повышение уровня триглицеридов в печени [179,180].

Большинство токсикологических исследований, посвященных фритюрным жирам, имеет дело не с отдельными химическими веществами, а с термически обработанными маслами в целом, при этом стараясь

максимально отразить технологические аспекты термической порчи масел и жиров.

В настоящее время, целостная картина влияния термически окисленных масел и жиров на организм не установлена, в связи с чем, исследования в данной области до сих пор ведутся очень активно. В таблице 5 приведены результаты ключевых исследований в области оценки токсичности термически обработанных масел.

Таблица 5 – Ключевые токсикологические исследования фритюрных жиров

Авторы	Модель	Основные результаты
Nolen, 1967 [80]	Внесение 15% фритюрных жиров в рацион крыс. Продолжительность: 2 года	Окисленные фритюрные масла обладали меньшей адсорбцией по сравнению с не окисленными, рост крыс снижен по сравнению с контролем. Отличия в смертности не значимы.
Nolen, 1973 [81]	Внесение 15% фритюрных жиров в рацион собак. Продолжительность: 1 год	Снижение накопления массы тела собак, получавших окисленные фритюрный жир. Иных патологических изменений не выявлено.
Gabriel, 1978 [181]	Внесение 15% отдельных фракций фритюрных жиров в рацион крыс. Продолжительность: 28 дней	Отмечены достоверные изменения жирнокислотного состава и множественные повреждения клеток печени.
Lang, 1978 [182]	Внесение 10% фритюрных жиров в рацион крыс. Продолжительность 10 лет (2 поколения крыс)	Отмечено небольшое повышение смертности крыс во втором поколении, получавших окисленный фритюрный жир.
Izaki, 1984 [58]	Внесение 15% фритюрных жиров в рацион крыс. Продолжительность: 13 недель	Отмечено повышение массы печени, почек, восстановленного глутатиона, а также дозависимое повышение тиобарбитурового числа в печени.
Lamboni, 1996 [183]	Внесение 15% фритюрных жиров в рацион крыс. Продолжительность: 10 недель	Отмечено достоверное повышение содержания цитохрома P450 и b5, повышение активности НАДФ-цитохром P450 редуктазы, снижение активности карнитинпальмитоилтрансферазы-1, изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у животных,

		получавших окисленные фритюрные жиры.
Narasimhamurthy, 1999 [184]	Внесение 5% и 20% фритюрных жиров в рацион крыс. Продолжительность: 20 недель	У крыс, получавших окисленный фритюрный жир, отмечено повышение уровня холестерина в плазме крови при понижении уровня ЛПВП и повышении уровня ЛПНП и ЛПОНП; также отмечено повышение уровня арахидоновой кислоты по сравнению с контрольной группой животных..
Indrat, 2002 [68]	Внутрижелудочное введение беременным крысам 0,3 мл фритюрного жира. Продолжительность: Первые 12 дней беременности	Отмечено повышение уровня продуктов окисления липидов и понижение уровня α -токоферола в тканях животных, получавших окисленный фритюрный жир. Выявлено существенное увеличение частоты дефектов развития плода
Chao, 2007 [185]	Внесение 5% фритюрных жиров в рацион крыс. Продолжительность: 5-9 недель	Показано, что крысы, получавшие окисленный фритюрный жир, были менее склонны к ожирению, но более склонны к нарушению толерантности к глюкозе
Ringseis, 2007 [186]	Внутрижелудочное введение беременным крысам 2 мл фритюрного жира. Продолжительность: Первые 21 день беременности	Показано, что компоненты окисленных фритюрных жиров, активирующие PPAR α , способны влиять на активность PPAR α в печени плодов, а также на уровень триглицеридов в печени плода на ранних стадиях развития беременности.
Totani, 2008 [187]	Внесение 7% фритюрных жиров в рацион крыс. Продолжительность: 12 недель	Показано, что окисленные фритюрные жиры характеризуются низкой цитотоксичностью. Наиболее токсичными компонентами фритюрных жиров являются летучие вещества.
Chiang, 2011 [188]	Внесение 5 и 20% фритюрных жиров в рацион мышей. Продолжительность: 8 недель	Показано, что внесение окисленных фритюрных жиров в рацион мышей ухудшает метаболизм глюкозы, провоцируя окислительный стресс и нарушая секрецию инсулина в клетках островков Лангерганса. Нарушения могут быть предотвращены дополнительным введением в рацион витамина E.
Huang, 2014 [189]	Внесение 10% различных фракций фритюрных жиров в рацион беременных мышей. Продолжительность: 18 дней	Показано, что окисленные фритюрные жиры обладают тератогенными свойствами (преимущественно за счет полярной фракции), связанными с нарушением метаболизма ретиноевой кислоты как у матери так и у плода за счет регуляции активности PPAR α и арил-гирокарбонового рецептора.

Первое существенное токсикологическое исследование фритюрных жиров было проведено в 1967 группой во главе с Nolen, которая поставила хронический эксперимент по замене жирового компонента стандартного рациона крыс на термически окисленное масло. Продолжительность эксперимента составила 2 года, в результате была показана низкая адсорбция окисленных масел по сравнению с не окисленными, а также снижение роста крыс, получавших окисленный жир. Иных патологий выявлено не было.

Для подтверждения достоверности своих результатов в 1973 авторы повторили эксперимент на собаках и получили схожие результаты, свидетельствующие лишь о снижении массы тела опытных животных по сравнению с контрольными.

В 1978 году Gabriel и соавторы провели более детальное изучение последствий замены жирового компонента рациона в остром эксперименте, в результате чего было установлено достоверное изменение жирнокислотного состава и множественные повреждения клеток печени у опытных животных.

В том же году Lang и соавторы провели самое масштабное исследование токсичности фритюрных жиров, которое длилось 10 лет. В данном эксперименте замену жирового компонента рациона проводили для двух поколений опытных животных, что позволило выявить повышение смертности крыс во втором поколении, получавших окисленный фритюрный жир.

В 13-ти недельном эксперименте Izaki с соавторами показали достоверное повышение массы печени, почек, восстановленного глутатиона, а также дозозависимое повышение тиобарбитурового числа в печени у опытных животных по сравнению с контрольной группой.

Lamboni с соавторами в 10-ти недельном эксперименте выявили достоверное повышение содержания цитохрома P450 и b5, повышение активности НАДФ-цитохром P450 редуктазы, снижение активности карнитинпальмитоилтрансферазы-1, изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-

фосфатдегидрогеназы у животных, получавших окисленные фритюрные жиры.

При внесении в рацион более высокого количества термически окисленных масел Narasimhamurthy с соавторами отметили повышение уровня холестерина в плазме крови при понижении уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и повышении уровня липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП); также отмечено повышение уровня арахидоновой кислоты у крыс, получавших окисленный фритюрный жир, по сравнению с контрольной группой животных.

В 2002 и 2007 годах Indrati Chao было проведено два очень важных исследования, показавших сильное тератогенное действие термически окисленных масел, и их значительное влияние на углеводный обмен лабораторных животных в остром и субхроническом экспериментах. Данные исследования послужили основанием для дальнейшего, более тщательного изучения влияния фритюрных жиров на углеводный обмен и развитие плода.

Так к 2014 году в острых и субхронических экспериментах было показано, что компоненты окисленных фритюрных жиров, активирующие PPAR α , способны влиять на активность PPAR α в печени плодов, а также на уровень триглицеридов в печени плода на ранних стадиях развития беременности; при этом внесение окисленных фритюрных жиров в рацион мышей ухудшает метаболизм глюкозы, провоцируя окислительный стресс и нарушая секрецию инсулина в клетках островков Лангерганса; окисленные фритюрные жиры обладают тератогенными свойствами (преимущественно за счет полярной фракции), связанными с нарушением метаболизма ретиноевой кислоты, как у матери, так и у плода за счет регуляции активности PPAR α и арил-гирокарбонового рецептора.

Несмотря на то, что механизмы токсического действия термически окисленных масел и жиров не до конца изучены, имеющихся сведений достаточно для того, чтобы показать необходимость регулярного контроля

фритюрных жиров с целью минимизации рисков их токсического воздействия на организм человека.

2.3 Методы регулирования окислительных процессов

Принимая во внимание большое количество факторов, инициирующих окисление липидов, а также цепной механизм развития окислительных процессов, следует констатировать, что не существует универсального способа предотвращения окислительной порчи жировых продуктов. По этой причине необходимо оценивать основные факторы окисления липидов и подбирать соответствующие способы их ингибирования для каждой конкретной пищевой системы. Ключевым способом увеличения устойчивости жировых продуктов к окислению является введение антиоксидантов.

Перед введением в рецептуру продукта антиоксидантов необходимо принимать во внимание наличие эндогенных антиоксидантов в исходных маслах, которые являются метаболитами второго рода и предотвращают процессы окисления липидов. Например, естественные количества токоферолов в растениях тесно коррелируют с содержанием хлорофилла и ненасыщенных жирных кислот [19,190].

Стоит также учитывать, что вследствие технологической обработки (дегуммирования, нейтрализации, отбеливания и дезодорации) растительных масел происходит значительная потеря многих эндогенных биологически активных веществ (рис. 3) [191].

Одним из наиболее распространенных и способствующих окислению технологических приемов, применяемых в масложировой промышленности, является эмульгирование. В процессе получения эмульсий образуется устойчивая мелкодисперсная система, в которой за счет увеличения площади контакта фаз растворенный в воде кислород активнее вступает в реакцию с жировой фазой, катализируя процессы окисления.

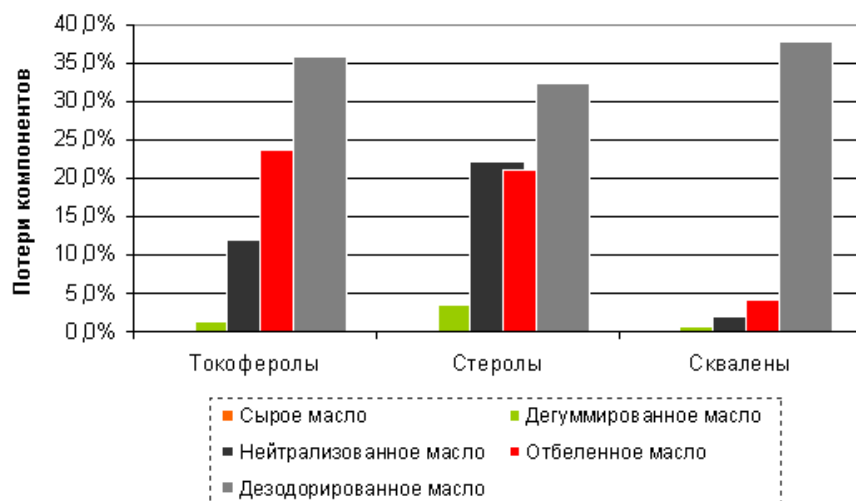


Рисунок 3 – Потери основных эндогенных антиоксидантов при различных типах обработки соевого масла [191]

Кроме влияния различных факторов окисления липидов в конкретной пищевой системе, также существенны условия применения антиоксидантов и особенности механизма их антиокислительного действия (рис. 1) [14]. По механизму действия антиоксиданты подразделяют на первичные и вторичные.

К первичным антиоксидантам, относятся, прежде всего, перехватчики свободных радикалов, представляющие собой химические соединения, связывающие свободные липидные радикалы. В результате данного взаимодействия образуются малоактивные радикалы, прерывающие цепную реакцию автоокисления. По схожему механизму действуют антиоксиданты фенольной природы, такие как токоферолы, убихинон и катехины.

К данной группе относится большинство антиоксидантов. Их основным недостатком является отсутствие возможности влиять на процесс инициации образования цепи окисления липидов. Также, в связи с тем, что основой механизма ингибирования липидных радикалов является их замена на антиоксидантные радикалы, обладающие меньшей реакционной способностью, возникает риск проявления прооксидантного эффекта при введении высоких доз антиокислителей данной группы.

Широко известно, что превышение оптимальной концентрации токоферолов не только не усиливает их антиокислительную активность, но и способствует проокислительному действию [192].

К первичным антиоксидантам также относятся хелаторы поливалентных металлов – вещества, способные образовывать устойчивые комплексы с металлами. Наиболее яркими представителями антиоксидантов данного типа являются лимонная, молочная кислоты и их соли, лецитин и этилендиаминтетрауксусная кислота. Данный тип антиоксидантов широко применяется в масложировой промышленности, так как почти во всех видах производств, при технологической обработке, масло контактирует с металлическими поверхностями.

К вторичным антиоксидантам относятся перехватчики активного кислорода. Основными представителями этой группы являются β -каротин, токотриенолы и сквалены. Свое действие они проявляют за счет наличия в их структуре двойных связей, на окисление которых расходуется активный кислород.

При использовании антиоксидантов необходимо также учитывать их гидрофильно-липофильную природу. По данному признаку можно выделить две группы антиокислителей: жирорастворимые и водорастворимые. Особенно важна природа антиоксидантов при их использовании в дисперсных системах, так как в зависимости от типа эмульсии антиоксиданты проявляют совершенно разные свойства (рис. 4) [193].

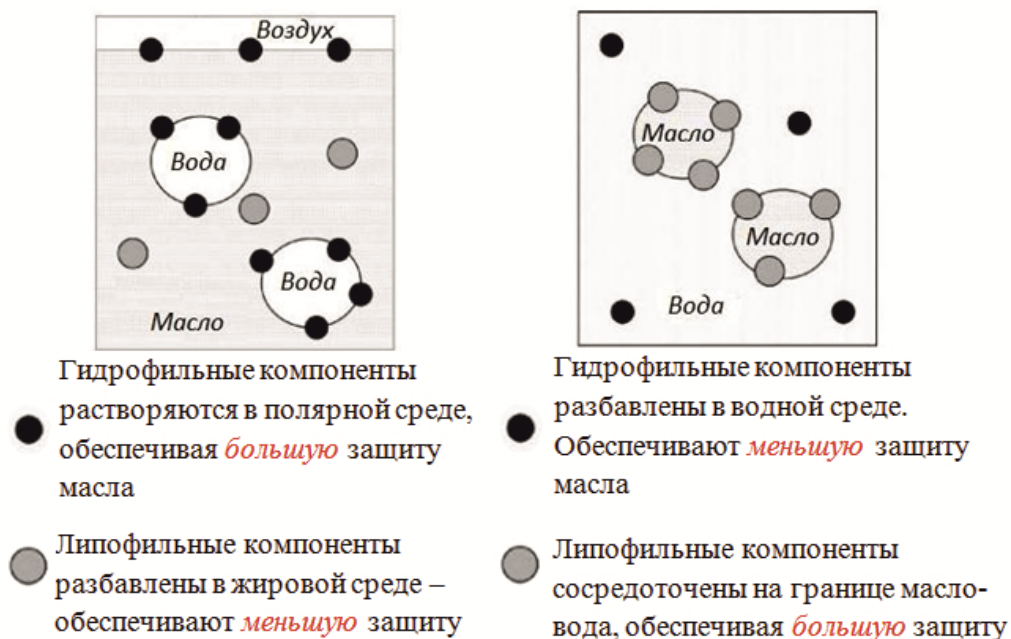


Рисунок 4 – Распределение гидрофильных и гидрофобных компонентов в прямых и обратных эмульсиях [193]

Наиболее эффективным является такое сочетание типа эмульсии и антиоксиданта, при котором активный компонент сосредоточен внутри дисперсной фазы, охватывая почти всю поверхность контакта фаз. К водорастворимым антиоксидантам относятся: витамины С и Р, вся группа витаминов В, микроэлементы. К группе жирорастворимых антиоксидантов можно отнести витамины А и Е, каротиноиды и некоторые другие.

Учитывая вышеописанные аспекты, становится очевидной необходимость использования антиоксидантов с учетом механизма ингибирования окислительных процессов. Кроме того, важно подбирать такие сочетания антиоксидантов, которые способны комплексно воздействовать на факторы окисления липидов в конкретной пищевой системе, проявляя синергический (синергетический) эффект.

Явление синергизма заключается в том, что антиоксидантная активность, полученная при сочетании индивидуальных компонентов, намного превосходит суммарный вклад каждого антиоксиданта в отдельности. Проведено большое количество исследований, доказывающих

синергический характер взаимодействия антиоксидантов, используемых в пищевой промышленности (табл.6).

Таблица 6 – Синергетические взаимодействия некоторых антиоксидантов

Антиоксидант	Синергист	Соотношения	Исследуемая модель	Предполагаемый механизм взаимодействия
Токоферолы	Лецитины+ аскорбил пальмитат[193]	2:0,5:0,1*	Окисление рыбного жира при 20 °С	Восстановление токоферильного радикала и токоферилхинона
	Лецитины+ аскорбил пальмитат[194]	0,05:0,5:1*	Окисление этиллинолеата при 110 °С	
	Кверцетин[34]	7,7:15,2	Метиллинолеат + α,α' -азоизобутиронитрил	Восстановление токоферильного радикала
	(+) Эпикатехин[34]	3,9:7,9		
	(-) Эпикатехин[34]	7,7:15,2		
Мирицетин[195]	0,0125:0,01*	Окисление триглицеридов подсолнечного масла	Не предложен	
Экстракт розмарина	Аскорбил пальмитат[196]	0,02:0,02*	Окисление маргарина при 60 °С	Восстановление радикалов
	Токоферолы+ лецитин[196]	0,02:0,02:0,1*		Не предложен
(+) Катехин	Сульфит-анионы[197]	1:1	Колориметрические исследования антиоксидантов	Восстановление окисленных форм катехина
Ликопин	Токоферолы + аскорбиновая к-та + β -каротин[198]	1:0,33:0,01:0,72	Реакция антиоксиданта с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH)	Не предложен
Третбутил гидрохинон	Пирогаллол[199]	2:1	Окисление соевого масла при 110 °С	Димеризация и восстановление радикалов
	Пропилгаллат[199]	1:1		
	Бутилгидроксианизол[199]	2:1		

* Массовая доля компонентов в системе

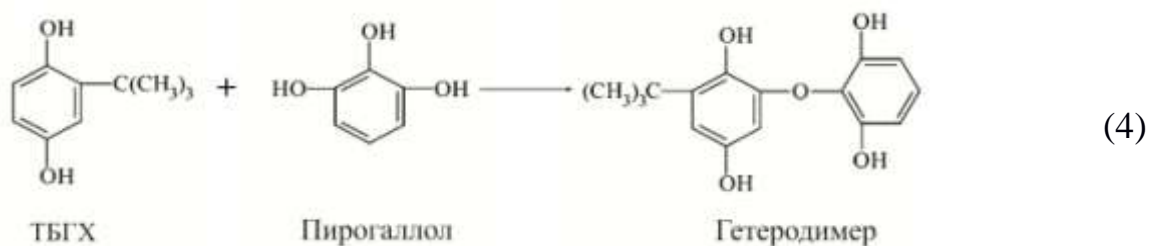
Синергический эффект может быть основан на различных типах взаимодействий компонентов. Одним из наиболее часто встречающихся и хорошо описанных типов синергических взаимодействий антиоксидантов в пищевых системах является так называемый «восстановительный синергизм», обусловленный тем, что окисленная форма активного

антиоксиданта восстанавливается менее активным, а потому и более стабильным антиокислителем.

В качестве наиболее яркого примера подобного рода взаимодействий можно привести комбинацию токоферолов с аскорбиновой кислотой. При их одновременном присутствии в пищевых системах аскорбиновая кислота восстанавливает токоферильный радикал до токоферола. Схожим принципом обусловлено большинство механизмов синергических взаимодействий с токоферолами.

Другим способом достижения синергических взаимодействий является сочетание антиоксидантов, обрывающих цепь окисления липидов с хелаторами металлов. Как уже упоминалось выше, ионы поливалентных металлов не только разрушают гидроперекисные группы с образованием свободных радикалов, но и могут выступать в роли инициаторов цепей окисления. В связи с этим, хелатирование поливалентных металлов резко снижает скорость инициации цепей окисления, что при условии присутствия антиоксиданта, способного ингибировать свободные радикалы, приводит к значительному увеличению общей антиоксидантой активности системы. Примером данных комбинаций может служить сочетание фенольных антиоксидантов с лимонной кислотой.

Интересным представляется синергический эффект, проявляющийся в случае, когда два компонента взаимодействуют с образованием более сильного антиоксиданта, активность которого значительно превышает активность изначальных компонентов. Подобный механизм проявления синергических взаимодействий характерен, например, для третбутилгидрохинона (ТБГХ) и пирогаллола (реакция 4). В результате их взаимодействия образуется димер, обладающий более выраженным антиоксидантным эффектом.



Несмотря на то, что данный вид синергических взаимодействий антиоксидантов оказывает значительное влияние на общую антиоксидантную активность, в литературе информации о подобных сочетаниях пищевых антиоксидантов очень мало.

Существует достаточно широкий список бинарных и многокомпонентных систем антиоксидантов с доказанным синергическим эффектом, механизм которых изучен не до конца. В настоящее время на рынке пищевых ингредиентов представлены композиции антиоксидантов с синергическим эффектом. Наиболее часто встречаются сочетания токоферолов с аскорбиновой кислотой и аскорбилпальмитатом. Однако эффективное применение таких комплексных ингредиентов возможно только в случае понимания механизмов их действия, условий применения в различных пищевых системах с учетом жирнокислотного состава триглицеридов и зависимостей доза/эффект.

2.4 Нормативное регулирование в области контроля качества и безопасности окисления масложировых продуктов

Нормативное регулирование в области контроля окислительных процессов в маслах и жирах различается между отдельными странами, однако, несмотря на большое разнообразие токсических веществ, образующихся при окислении жиров, общим для всех стран является ограниченная нормативная база методов контроля показателей окислительной порчи.

2.4.1 Нормативное регулирование в области контроля окислительной порчи масел, жиров и жировых продуктов

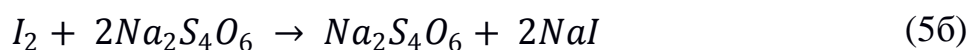
Основным нормативным документом, устанавливающим гигиенические показатели окислительной порчи жировых продуктов, являются «Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (Глава II Раздел 1. Требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов)» в соответствии с которыми вводятся два основных показателя: перекисное число и кислотное число.

Значение перекисного числа не должно превышать 10 мэкв [O]/кг, а кислотного числа – 0,6 мг КОН/г с небольшими вариациями для нерафинированных масел и оливкового масла.

Для растительных масел отдельно установлен норматив на анизидиновое число, который не должен превышать 3 ед/г масла.

На международном уровне, в соответствии с документами Codex Alimentarius (CODEX STAN 210-1999), также используются показатели перекисного и анизидинового чисел, значения которых соответствуют требованиям Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований, но в дополнение к ним введен показатель содержания летучих веществ при 105 °С, который не должен превышать 0,2% по массе. Данный стандарт не регламентирует содержание анизидинового числа в маслах и жирах.

Значение перекисного числа определяется титриметрической идентификацией йода, выделившегося при взаимодействии йодида калия с перекисными соединениями в кислой среде, тиосульфатом натрия (реакции 5 а-б).



Недостатками данного метода являются абсорбция йода ненасыщенными связями жирных кислот и образование I_2 из KI под действием кислорода, растворенного в титруемой смеси [200]. Результаты измерений также могут быть искажены в силу различий в структуре и реакционной активности пероксидов, температуры и времени проведения реакции. Данный метод также дает ложные результаты при измерении низких значений перекисного числа, связанных со сложностью определения конечной точки титрования.

Использование, регламентированных методов оценки показателей безопасности масел и жиров хорошо применимо к безводным средам, однако их использование для масличного сырья и эмульсионных продуктов сопряжено с повышением погрешности результатов исследований. Как было показано Velasco и Cesa с соавторами, типы экстракции и сырья оказывают существенное влияние на значение перекисного, кислотного и анизидинового чисел [38,201].

Данное обстоятельство обуславливает необходимость поиска новых путей оценки окислительной стабильности эмульсионных жировых продуктов и масличного сырья, не требующего экстракции жировой фазы.

2.4.2 Нормативное регулирование процессов жарки во фритюре

Фактически, нормативное регулирование качества фритюрных жиров началось в 1973 году по инициативе Немецкой Ассоциации по Изучению Жиров. Было установлено, что фритюрные масла следует считать непригодными к дальнейшему использованию, при следующих условиях:

1. Органолептические показатели масла (вкус, запах и цвет) неудовлетворительные;
2. При удовлетворительных органолептических показателях:
 - а. Содержание нерастворимых в петролейном эфире окисленных жирных кислот равно 1 %;

- б. Содержание нерастворимых в петролейном эфире окисленных жирных кислот больше или равно 0,7% и температура дымообразования ниже 170 °С.

Нерастворимые в петролейном эфире вещества представляют собой фракцию полярных веществ в масле, которые относятся к вторичным продуктам окисления.

Дальнейшее развитие норм регулирования связано с развитием более доступных методов, находящихся в тесной корреляции с этими критериями.

В СССР регулирование показателей качества фритюрных жиров в соответствии с «Инструкциями по жарке изделий во фритюре в предприятиях общественного питания и контролю за качеством фритюрных жиров» (1990 г.) применялась схожая схема оценки качества фритюрных жиров, включающая:

1. Органолептический анализ;
2. Определение содержания нерастворимых в петролейном эфире окисленных жирных кислот (не выше 1%) – арбитражный метод;
3. Ряд физико-химических методов, откалиброванных по арбитражному методу (содержание конъюгированных жирных кислот, реакция с метиленовым голубым (синим), оценка показателя преломления).

В настоящее время в России на законодательном уровне нет установленных методов по контролю качества фритюрного жира. Единственным документом, затрагивающим процессы жарки во фритюре, являются СанПиН 2.3.6.1079-01 "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям общественного питания, изготовлению и оборотоспособности в них продовольственного сырья и пищевых продуктов", которые заменили собой СанПиН 42-123-5777-91.

В международной практике контроль качества фритюрного жира осуществляют по той же схеме:

1. Органолептическая оценка
2. Содержание нерастворимых в петролейном эфире окисленных жирных кислот в качестве арбитражного метода (не выше 1%) – в некоторых странах заменен на содержание ОПВ методом колоночной хроматографии (см выше)
3. Физико-химические методы, откалиброванные с арбитражным методом (тест-полоски, наборы реактивов для цветных реакций, измерение диэлектрической проницаемости масел)

В некоторых странах в качестве критерия контроля качества используют также показатели точки дымообразования и содержание свободных жирных кислот (табл. 7).

Таблица 7 – Международные нормы по качеству фритюрного жира

Страна	Минимум	Максимум				
	ТД, °С	КЧ, %	СЖК, %	ОЖК, %	ОПВ, %	ПС, %
Австрия	170	2,5		1	27	
Бельгия	170				25	10
Чили	170		2,5	1	25	
Франция					25	
Италия					25	
Нидерланды						16
ЮАР					25	16
Испания					25	

ТД- температура дымообразования, КЧ – кислотное число, СЖК – свободные жирные кислоты, ОЖК – окисленные жирные кислоты, ОПВ – общие полярные вещества, ПС – полярные соединения

Необходимо отметить, что имеющиеся в Российской Федерации нормативные документы не дают понимания о том, какими методами контроля качества жира пользоваться. СанПиН 2.3.6.1079-01 рекомендуют применять органолептическую оценку фритюрных жиров, а также использовать показатель «содержание вторичных продуктов окисления»,

который не должен превышать 1%. Однако, действующие СанПиН не регламентируют методы контроля содержания вторичных продуктов окисления, в то время как в СанПиН 42-123-5777-91 для данного показателя введено два метода контроля: цветная реакция с метиленовым голубым и рефрактометрическое измерение показателя преломления для масла.

2.5 Выводы

Таким образом, данные, представленные в обзоре литературы, свидетельствуют о большом разнообразии продуктов окисления липидов, возможных путей их образования, а также о существенном токсическом эффекте при их хроническом действии.

Несмотря на данное обстоятельство, отмечена недостаточность нормативной базы в области контроля качества и безопасности незаменимых для здоровья человека жировых и жиросодержащих продуктов, создающая условия, при которых не представляется возможным осуществление надлежащего контроля развития окислительных процессов.

В связи с вышеизложенным, **целью исследования** являлось совершенствование методов контроля и регулирования окислительных процессов в технологии отдельных жировых продуктов.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

1. Разработать объектно-ориентированную базу данных химического состава масел и жиров для подбора оптимальных концентраций антиоксидантов с целью эффективного управления окислительными процессами;
2. Разработать чувствительный метод измерения окислительной порчи дисперсных жировых продуктов, не требующий предварительной экстракции липидов;
3. На основе анализа существующих методов разработать нормативно-методическую базу для контроля процессов окислительной порчи фритюрных жиров;
4. Провести скрининг ингибиторов липоксигеназ с целью регулирования процессов ферментативного окисления липидов в масличном сырье и нерафинированных маслах.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Характеристика используемых материалов и реактивов

3.1.1 Масла и жиры

1. Масла, использованные для лабораторной и производственной жарки во фритюре:

1.1.Вегафрай 01-02, Cargill, Россия

Состав: масло пальмовое рафинированное дезодорированное, масла растительные рафинированные дезодорированные: подсолнечное, пальмовый olein, E900, E319, E330, E1520.

1.2.Вегафрай 05-09, Cargill, Россия

Состав: масло пальмовое рафинированное дезодорированное, масла растительные рафинированные дезодорированные: подсолнечное, пальмовый olein, E900, E319, E330, E1520.

2. Масла и жировые продукты, использованные при определении окислительной стабильности:

Все образцы удовлетворяли требованиям Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (Глава II, раздел I)

2.1.Масло подсолнечное рафинированное, дезодорированное

2.2.Масло соевое рафинированное, дезодорированное

2.3.Масло сливочное сладко-сливочное, высший сорт по ГОСТ Р 52969-2008 «Масло сливочное. Технические условия»

3.1.2 Антиоксиданты

1. NovaSOLC – 10% аскорбиновой кислоты в мицеллированной форме

Состав: эмульгатор, аскорбиновая кислота (E300), дистиллированная вода

2. NovaSOLE – 7% концентрата смеси токоферолов в мицеллированной форме

Состав: эмульгатор, dl- α -токоферол (E307)

3. NovaSOLRosemary – 6% карнозиновой кислоты в мицеллированной форме

Состав: эмульгатор, экстракт розмарина (E392)

4. NovaSOLCOF – 10% аскорбиновой кислоты, 0,5% альфа-токоферолов в мицеллированной форме

Состав: эмульгатор, dl- α -токоферол (E307), аскорбиновая кислота (E300), дистиллированная вода

5. NovaSOLCacaoPoly- 5.5% полифенолов в мицеллированной форме

Состав: эмульгатор, полифенолы какао

6. NovaSolChia – масло чиа с натуральным содержанием токоферолов.

3.1.3 Модели липоксигеназы и лигандов

1. Кристаллическая структура липоксигеназы-1 сои:

- a. Метод получения данных: рентгенно-структурный анализ
- b. Разрешение: 1,4 Å
- c. Температура: 100 K
- d. Название файла: 1YGE.pdb
- e. Источник: <http://www.rcsb.org/>[202]

2. Список использованных лигандов:

Антоцианидины: Аурантинидин, Цианидин, Дельфинидин, Мальвидин, Пеларгонидин, Пеонидин, Петунидин, Розинидин

Антоксантины: 5-О-Деметилинобилетин, Акацетин, Апигенин, Байкалеин, Байкалин, Хризин, Циреимаритин, Цирсилиол, Цинарозид, Датисцетин, Диосметин, Диосмин, Физетин, Флавоон, Галангин, ГарденинD,

Гиепидулин, Госсипетин, Гиполактин, Изоориентин, Кампферид, Кампферол, Куматакенин, Лютеолин, Морин, Мирицетин, Мирицитрин, Норартокарпетин, Ориентин, Педалитин, Кверцетаген, Кверцетин, Кверцетрин, Рамнетин, Робинетин, Робинин, Рутин, Скutelлареин, Сидеритифлавои, Силибин, Тамариксетин, Тангеретин, Тектохризин, Троксерутин, Виценин-2, Витексин, Вогонин, Вогонозид, Ксантомикрол

Ауроны: Ауреузидин, Маритиметин, Сульфуретин

Халконы: 2'-Гидроксихалкон, 2-Гидроксихалкон, 4'-Гидроксихалкон, 4-Гидроксихалкон, Бутеин. Халкон, Кореопсин, Изоликвиритигенин, Оканин, Флоретин, Флоридзин, Стиллопсин

Дигидрофлавоны: Аромадендрин, Фустин, Пинобаксин, Таксифолин

Флаваны: (-)-Эпиафцелехин, (-)-Эпикатехин, (+)-Катехин, (+)-Галлокатехин, Физетинидол, Робинетинидол

Флаваноы: Эриодиктиол, Гесперидин, Гесперитин, Ликвиритигенин, Ликвиритин, Нарингенин, Нарингин, Пиноцембрин, Прунин, Салипурпозид

Изофлавоны: Биоханин А, Даидзеин, Формононетин, Генистеин

3.2 Методы определения гигиенических показателей жировых продуктов

Определение перекисного числа проводили *титриметрическим* методом в соответствии с ГОСТ Р 51487-99[203].

Определение анизидинового числа спектрофотометрическим способом в соответствии с ГОСТ 31756-2012 (ISO 6885:2006) [204]

Определение коэффициентов экстинкции проводили в соответствии с ISO 3656:2011 [205].

Определение кислотного числа проводили в соответствии с ГОСТ 31933-2012[206].

3.3 Метод определения окислительной стабильности жировых продуктов

Определение окислительной стабильности жировых продуктов проводили по периоду индукции при помощи реактора окислительной стабильности OXITEST (Velpscientifica), сертифицированного в соответствии с ISO9001/ISO14001/OHSAS18001 [5, 6, 7].

Принцип измерения заключается в изотермическом окислении исследуемого образца кислородом при повышенных температурах. Анализ осуществляли следующим образом: исследуемый образец помещали в камеру, в которой производится нагрев до 90 °С и нагнетание кислорода до давления равного 6 Бар. Затем, при постоянной температуре, регистрировали изменение давления кислорода в камере, которое соответствует его расходу на окисление образца. После чего, графически определяли период индукции – время до начала резкого окисления образца – в соответствии с ГОСТ Р 53160-2008 [8].

Исследование образцов чипсов проводили по следующей методике:

1. Взвешивали 30 г чипсов из каждой пачки.
2. Навески образцов измельчали до достижения среднего размера частиц, равного 2-3 мм.
3. От каждого вида чипсов отбирали среднюю пробу массой 10 г и помещали в чаши измерительного прибора OXITEST.
4. Проводили испытание по описанной выше методике.

Все эмульсии для исследований получали при помощи диспергатора «Heidolph SilentCrusher M» по одинаковой методике:

1. В стеклянной колбе взвешивали необходимое количество масла.

2. Вносили отмеренное количество воды.
3. Водорастворимые антиоксиданты растворяли заранее в водной среде, а жирорастворимые – в масле.
4. Диспергировали смесь в течение 7 минут при постоянной скорости вращения лопастей диспергатора 15 тыс. об/мин.

3.4 Метод инфракрасной спектроскопии с преобразованиями Фурье

ИК-спектры образцов масел были получены при помощи ИК-Фурье спектрометра TENSOR (Bruker Corporation, Germany) с использованием метода жидкой пленки. В качестве итогового спектра образца были использованы усредненные данные по 64-м измерениям в диапазоне частот от 4000 до 400 см⁻¹ в трех повторностях.

3.5 Методы определения общих полярных веществ

Сущность метода определения содержания общих полярных веществ (ОПВ) состоит в разделении пробы методом колоночной хроматографией на полярные и неполярные. Хроматографическую колонку 21x450 мм набивали специально приготовленным силикагелем с размером частиц от 70 до 230 меш с содержанием влаги 5 %. Элюирующий раствор готовили смешением 87 объемов петролейного эфира и 13 объемов диэтилового эфира. Приемную круглодонную колбу объемом 500 мл высушивали до постоянного значения массы. Навеску жира 2,5 г растворяли в конической колбе в 50 мл объеме элюента, затем отбирали 20 мл и переносили в колонку, собирали элюат, промывая колонку 150 мл раствора элюента. Элюент испаряли на ротационном испарителе, колбу взвешивали после высушивания три раза до постоянной массы. Определяли содержание неполярных веществ по разности массы колбы пустой и с образцом. Из массы навески вычитали количество неполярных веществ для определения содержания полярных веществ, удерживаемых колонкой. Содержание полярных веществ определяли в процентах.

Массовую долю полярных веществ, W , %, вычисляли по формуле

$$W = 100 - \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m}$$

где

m_1 – масса, в граммах, колбы плюс масса неполярных веществ;

m_2 – масса, в граммах, пустой колбы

m – масса, в граммах, пробы в 20 мл раствора образца.

За результат принимали среднее арифметическое двух определений, если они удовлетворяли условиям повторяемости. Результат округляли до одного десятичного знака.

Определение содержания ОПВ кондуктометрическим способом проводили с применением прибора FOM 320 в соответствии с инструкцией к прибору. Для проведения исследований очищенный и откалиброванный датчик прибора погружали во фритюрный жир при температуре 140-180 °С до уровня, указанного на приборе. Измерения проводили в двух повторностях. Перед повторным измерением датчик прибора очищали сухой салфеткой из нетканого материала.

3.6 Процедура жарки картофеля в лабораторных условиях

Жарку в лабораторных условиях проводили параллельно в двух алюминиевых емкостях при средней температуре 160-180 °С с постоянным перемешиванием содержимого при помощи магнитной мешалки. Первая емкость была заполнена маслом 01-02, вторая – маслом 05-09. Замороженный картофель при помощи сетки погружали в емкости, жарку проводили до достижения оптимальных органолептических показателей обжариваемой продукции, после чего обжариваемый продукт удаляли из емкости.

Содержание влаги в системе регулировали изменением соотношения «масло:картофель» с учетом содержания влаги в картофеле (62,4%). В

первом эксперименте соотношение составляло 9:1 (содержание влаги 7 %), во втором эксперименте 6:1 (содержание влаги 11%).

3.7 Процедура жарки картофеля в производственных условиях

Жарку картофеля в производственных условиях проводили в соответствии со стандартным протоколом технологической выработки на предприятии.

Для предприятий общественного питания жарка проводилась аналогично лабораторной процедуре. Основным отличием являлись тип и объем емкостей для жарки, которые в данном случае представляли промышленные фритюрницы, оборудованные проточными фильтрами для крупных частиц обжариваемого материала.

Жарка в условиях производства снековой продукции (чипсов) проводилась в проточном режиме, включая следующие этапы: очищенные и нарезанные ломтики картофеля промывали водой с добавлением полидиметилсилоксана в качестве пеногасителя, избыток воды с картофеля убирали потоком воздуха; обработанный картофель подавали в жарочную печь, в которой поддерживалась постоянная температура масла 160-180 °С; среднее время нахождения картофеля в печи составляло порядка 1 минуты.

3.8 Процедура исследований фермент-лигандных комплексов методом молекулярного докинга

При проведении молекулярного докинга использовали стандартную процедуру исследования по структурному соответствию (structure-based), детально описанному Kitchen с соавторами [207]. Проведение данного эксперимента заключается в подготовке структурных данных изучаемого фермента, определении активного центра, валидации параметров активного центра, генерировании различных конформаций лигандов в активном центре фермента и последующей оценке параметров связывания образовавшихся комплексов.

Для генерирования различных конформаций и получения расчетных значений кинетических параметров образования лиганд-ферментных комплексов был использован программный комплекс LeadIt[208] с модулями Flexx[209] для генерирования конформаций и Hyde[209–212] для оценки свободной энергии связывания комплекса.

3.9 Методы статистической обработки экспериментальных данных

Статистическая обработка данных, а также их визуализация были произведены при помощи пакета программ Statistica 10 (StatSoft Inc, США).

При разработке прогностической системы для оценки эффективности полифенолов к ингибированию липоксигеназной активности был использован модуль «Искусственные нейронные сети», входящий в состав программы Statistica 10. В качестве критериев достоверности прогностической системы были использованы статистические критерии: среднеквадратическая ошибка, среднеабсолютная ошибка, среднеотносительная квадратическая ошибка, среднеотносительная абсолютная ошибка и коэффициент корреляции Пирсона.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Разработка объектно-ориентированной базы данных химического состава растительных и животных масел и жиров

Целью разработки базы данных являлось обобщение сведений о химическом составе нативных липидных систем для поиска оптимальных сочетаний антиоксидантов. Одной из основных групп антиоксидантов, присутствующих в нативных липидных системах являются токоферолы, которые присутствуют во всех растительных клетках, причем в физиологически обусловленном соотношении к содержанию хлорофилла [213]. Как было показано рядом исследователей, антиоксидантный эффект токоферолов синергетически усиливается в присутствии аскорбиновой кислоты и фосфолипидов [214–219]. С позиций регуляции окислительных процессов в жировых продуктах наиболее интересным является антиоксидантный эффект лецитина, проявляющийся в его способности к декомпозиции перекисных соединений по средствам их связывания с аминогруппой фосфолипида [220]. В связи с этим, одной из основных особенностей разрабатываемой базы данных стало включение информации о содержании обоих антиоксидантов.

На первом этапе работ была проведена разработка базы данных химического состава растительных и животных масел и жиров с целью обобщения имеющихся в открытом доступе литературных данных.

При составлении базы данных использовались сведения из научных публикаций в рецензируемых журналах, а также международных открытых баз данных и нормативных документов.

В общей сложности база данных состоит из 6 основных таблиц и 4 таблиц-связок (рис. 5).

Центральное положение в базе данных занимает таблица `oils`, содержащая информацию о названиях масел и их жирнокислотном составе. Каждому маслу присвоен уникальный идентификационный номер (`oil_id`). Таблица `oils` связана с остальными таблицами посредством таблиц-связок

(ref_oils, phosph_oils, toc_oils), в которых к каждому наименованию масла по значению «oil_id» присваивается соответствующее значение из других основных таблиц.

В таблице ref содержится информация о литературных источниках, из которых были получены данные для составления базы данных.

Таблица toc содержит информацию о содержании различных типов токоферолов и токотриенолов в нерафинированных маслах.

Таблица phosph содержит информацию о содержании различных типов фосфолипидов в нерафинированных маслах.

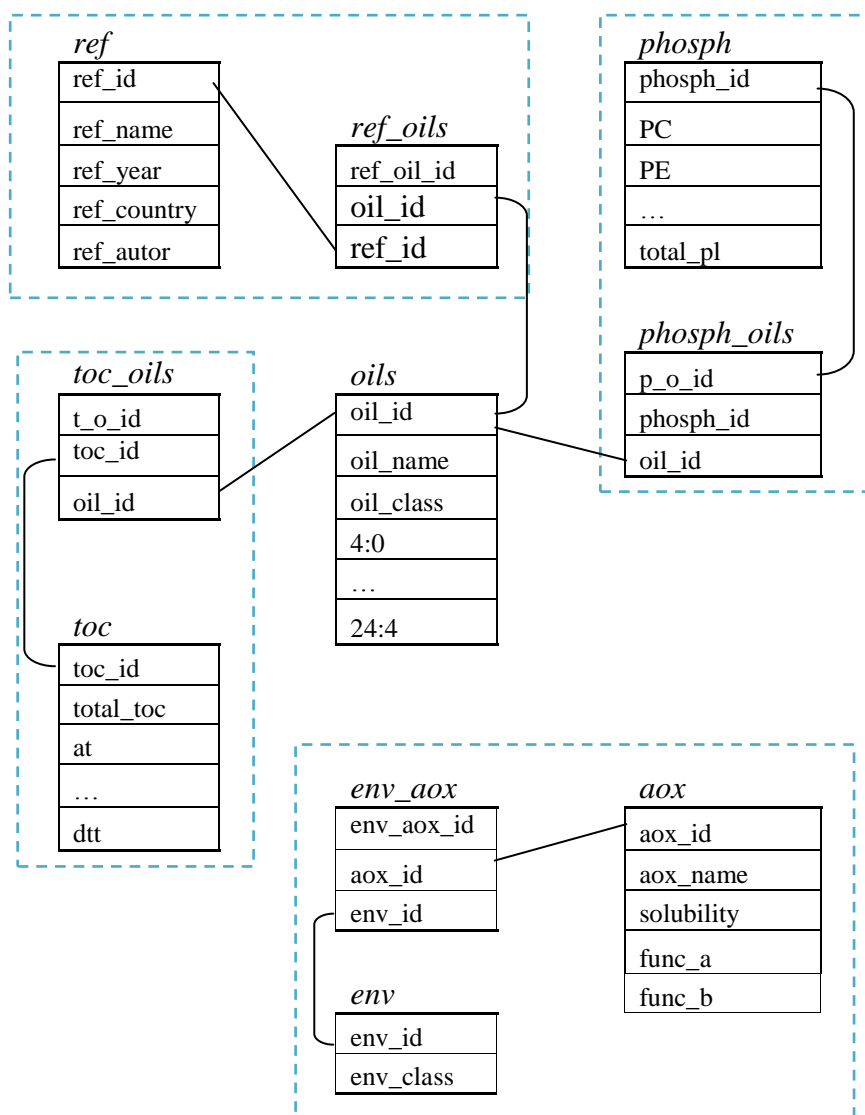


Рисунок 5. Структурная схема базы данных

Таблица аох содержит информацию об антиоксидантах: названия, сведения о растворимости и коэффициенты уравнений линейной зависимости с жирнокислотным составом масла.

Таблица env содержит значения возможных соотношений водной и жировой фазы в системе (безводный жир, прямая эмульсия, обратная эмульсия). Через данную таблицу осуществляется связь между конкретным типом системы и необходимым для использования антиоксидантом.

Сведения о корреляции между содержанием токоферолов, фосфолипидов и жирнокислотным составом были получены при анализе данных методом линейной регрессии. Результаты анализа представлены на рисунке 6 в виде иерархического дерева взаимосвязей.

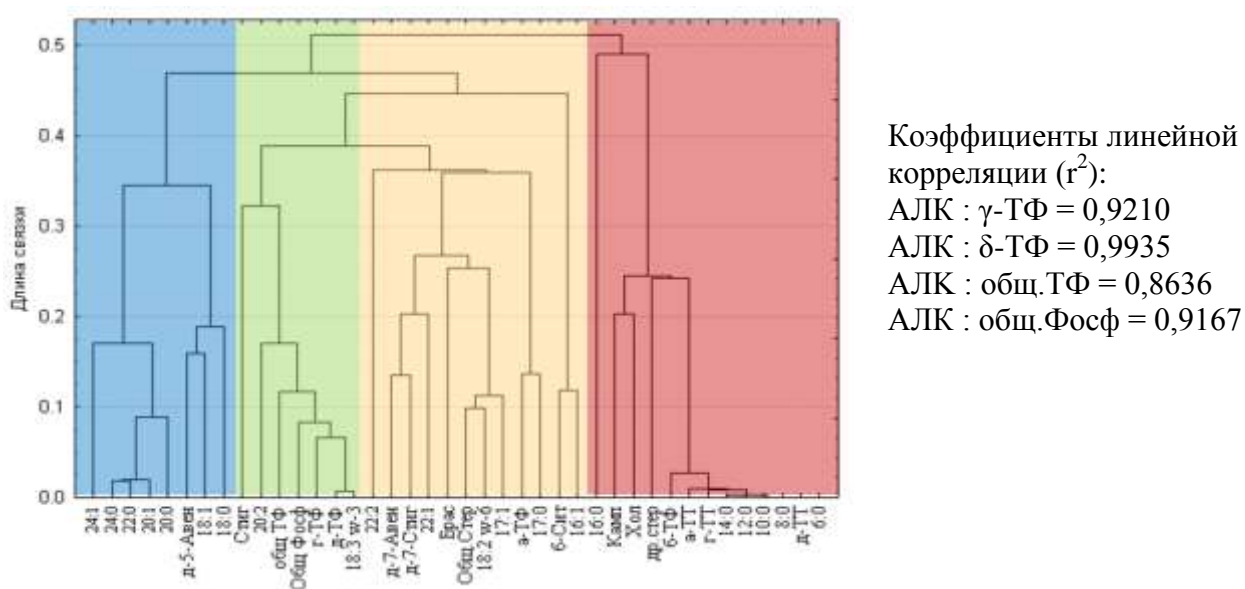


Рисунок 6 – Иерархическое дерево взаимосвязей содержания жирных кислот, фосфолипидов, стеролов и токоферолов в растительных маслах (ТФ – токоферол, ТТ – токотриенол, Фосф – фосфолипиды, Стер – стерины, Стиг – стигмастерол, Авен – авенастерол, Камп – кампстерол, Хол – холестерол)

В выборку для анализа вошли нерафинированные масла высших наземных растений. Длина связи на рисунке 6 соответствует значению $(1 - r^2)$, где r^2 – коэффициент линейной корреляции между показателями.

Результат анализа выявил тесную взаимосвязь между содержанием АЛК и γ -ТФ, δ -ТФ, а также общим содержанием токоферолов и фосфолипидов. Таким образом, показана взаимосвязь между содержанием

АЛК и основных компонентов системы антиоксидантной в нерафинированных маслах.

Разработанная база данных зарегистрирована в ФГБУ «Федеральный институт промышленной собственности» с выдачей свидетельства о государственной регистрации базы данных (см. Приложение Б).

Сведения о составе масел и необходимых количествах токоферола и фосфолипидов в качестве антиоксидантов были использованы при разработке многокомпонентных жировых продуктов, предназначенных для диетотерапии алиментарнозависимых заболеваний: растительно-жировой спред функционального назначения и специализированный липидный модуль.

Основной задачей при разработке пищевых продуктов являлась оптимизация жирнокислотного состава и обеспечение антиоксидантной защиты.

Составление рецептуры многокомпонентных жировых продуктов, соответствующих медико-биологическим требованиям, сопряжено с рядом трудностей, связанных, во многом, с вариацией химического состава исходного сырья, которая проявляется особенно заметно по отношению к биологически активным компонентам. Так, территориальные и сезонные вариации в жирнокислотном составе маслосодержащего сырья в среднем достигают 20-40 % [221–223], преимущественно, за счет изменения содержания линолевой, олеиновой, линоленовой и докозагексаеновой жирных кислот, представляющих наибольший интерес в рамках исследования.

При этом медико-биологические требования, предъявляемые к жировым продуктам, жестко регламентируют соотношения его основных компонентов. В результате, появляется необходимость в приближенных вычислениях химического состава с заданными значениями допустимого отклонения и относительной погрешности.

Для решения данной задачи были использованы методы линейного программирования с целью минимизации времени и повышения качества расчетов. При этом был использован массив данных о жирнокислотном составе растительных масел и животных жиров, обобщенный в разработанной базе данных.

В качестве критериев минимизации при расчетах были выбраны следующие:

- а. Максимальное время расчета: 100 с,
- б. Предельное число итераций: 1000,
- в. Относительная погрешность: $\pm 0,5$,
- г. Допустимое отклонение: 30 %,
- д. Сходимость: 0,00001,

при линейной оценке ошибок и алгоритмом Ньютона (метод касательных) для поиска решения.

В качестве базового параметра, характеризующего жировую основу растительно-жирового спреда, было использовано отношение содержания ω -6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) к ω -3 ПНЖК. Согласно МР 2.3.1.2432-08 «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации» данное отношение должно находиться в пределах от 6 до 10.

С учетом вариабельности химического состава жировых продуктов в качестве базового принято соотношение ω -6/ ω -3, равное 8.

Традиционно, для получения растительно-жировых спредов применяют пальмовое, соевое и рапсовое масла. Для достижения необходимого отношения ПНЖК состав жировой основы, включающей указанные масла, соответствует соотношению: 54%, 45% и 1% (основа №1).

Жирнокислотный состав данной основы приведен в таблице 8. Жирнокислотный профиль такой основы формируют три основные жирные кислоты: пальмитиновая, олеиновая и линолевая. Также в небольших количествах присутствуют стеариновая и α -линоленовая кислоты.

Реологические и органолептические свойства данной основы хорошо изучены и соответствуют требованиям, предъявляемым к спредам мягкой консистенции, предназначенным для фасовки в баночку.

Таблица 8 – Жирнокислотный состав основы №1

Кислота	Формула	Содержание
Капроновая (Гексановая)	6:0	0,000
Каприловая (Октановая)	8:0	0,000
Каприновая (Декановая)	10:0	0,000
Лауриновая (Додекановая)	12:0	0,359
Миристиновая (Тетрадекановая)	14:0	0,717
Пальмитиновая (Гексадекановая)	16:0	28,173
Пальмитолеиновая (Гексадеценная)	16:1 ω7	0,226
Маргариновая (Гептадекановая)	17:0	0,077
Гептадеценная	17:1 ω8	0,023
Стеариновая (Октадекановая)	18:0	4,238
Олеиновая (Октадеценная)	18:1 ω9	32,492
Линолевая (Октадекадиеновая)	18:2 ω6	29,943
α-Линоленовая (Октадекатриеновая)	18:3 ω3	3,743
Арахидиновая (Эйкозановая)	20:0	0,446
Эйкозеновая (Гондоиновая)	20:1 ω9	0,340
Эйкозодиеновая	20:2 ω6	0,029
Бегеновая (Докозановая)	22:0	0,225
Эруковая (Доказеновая)	22:1 ω13	0,481
Докозодиеновая	22:2 ω6	0,013
Лигноцериновая (Тетракозановая)	24:0	0,126
Нервоновая (Тетракозеновая)	24:1 ω9	0,020

К недостаткам данной основы относится высокое содержание пальмитиновой кислоты (преимущественно из пальмового масла), которая по имеющимся научным данным, заметно влияет на общую концентрацию сывороточного холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности, при этом, не меняя концентрацию холестерина липопротеинов высокой плотности, что является риском развития заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Высокое содержание в триглицеридах жирной основы пальмитиновой кислоты как фактора риска обуславливает необходимость замены

компонентов жировой основы спреда. С учетом специфики конечного продукта, жировую основу спреда составляли аналогично, автоматизированным методом, из кокосового, рисового и низкоэрукового рапсового масел, соотношение которых составило 37,5%, 43,5% и 19% соответственно (жировая основа № 2). Жирнокислотный состав жировой основы № 2 приведен в таблице 9.

Таблица 9 – Жирнокислотный состав основы №2

Жирная кислота	Формула	Содержание
Капроновая (Гексановая)	6:0	0,131
Каприловая (Октановая)	8:0	2,734
Каприновая (Декановая)	10:0	2,434
Лауриновая (Додекановая)	12:0	18,452
Миристиновая (Тетрадекановая)	14:0	7,272
Пальмитиновая (Гексадекановая)	16:0	12,275
Пальмитолеиновая (Гексадеценная)	16:1 ω7	0,166
Маргариновая (Гептадекановая)	17:0	0,028
Гептадеценная	17:1 ω8	0,028
Стеариновая (Октадекановая)	18:0	2,552
Олеиновая (Октадеценная)	18:1 ω9	33,027
Линолевая (Октадекадиеновая)	18:2 ω6	19,956
α-Линоленовая (Октадекатриеновая)	18:3 ω3	2,494
Арахидиновая (Эйкозановая)	20:0	0,366
Эйкозеновая (Гондоиновая)	20:1 ω9	0,629
Эйкозодиеновая	20:2 ω6	0,009
Бегеновая (Докозановая)	22:0	0,166
Эруковая (Доказеновая)	22:1 ω13	0,190
Докозодиеновая	22:2 ω6	0,009
Лигноцериновая (Тетракозановая)	24:0	0,159
Нервоновая (Тетракозеновая)	24:1 ω9	0,038

В этой жировой основе соотношение ω-6/ω-3 ПНЖК также равно 8, однако жирнокислотный состав представлен более широким спектром кислот: основными кислотами являются олеиновая, линолевая, лауриновая и пальмитиновая. В меньшей степени – миристиновая. Увеличилось содержание короткоцепочечных (C8) и среднецепочечных (C10) цепочечных жирных кислот.

Расчет рецептуры специализированного липидного модуля проводили в соответствии с более жесткими медико-биологическими требованиями, указанными в документах ФАО, которые, помимо соотношения ω -6/ ω -3 ПНЖК, указывают на необходимость соблюдения соотношений насыщенных, моно- и полиненасыщенных жирных кислот в рационе, а также на вклад отдельных типов жирных кислот для обеспечения достоверного положительного диетического или профилактического эффекта [224].

При этом расчет рецептуры проводили при условии, что содержание насыщенных жирных кислот стремится к минимуму, содержание ПНЖК находится в диапазоне от 6 % до 11 %, ω -3 ПНЖК в диапазоне от 1,5 % до 2 %, ω -6 ПНЖК в диапазоне от 2,5 % до 9 %, от общего содержания жирных кислот, а содержание докозагексаеновой кислоты составляет не менее 80 % от общего содержания ПНЖК.

Принимая во внимание большое разнообразие масел и жиров, которые могут являться потенциальными компонентами липидного модуля, и, как следствие, большое разнообразие их возможных комбинаций в конечном продукте, приведем три расчетные рецептуры, которые послужили основой для проведения лабораторных выработок экспериментальных образцов липидного модуля.

В общей сложности было разработано 3 рецептуры специализированного липидного модуля, которые приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Рецептуры специализированного липидного модуля

Ингредиенты	Массовая доля компонентов, %		
	Рецептура №3	Рецептура №4	Рецептура №5
ЖИРОВАЯ ФАЗА	60,00	60,20	60,00
Масло микроводорослей	2,739	2,966	2,742
Масло кокосовое	1,741	3,750	—
Высокоолеиновое подсолнечное масло	—	53,176	—
Пальмовое масло	—	—	4,526
Пальмоядровый олеин	—	—	52,418
Оливковое масло	55,208	—	—

Лецитин	0,300	0,300	0,300
dl- α –токоферол	0,007	0,007	0,007
β -каротин	0,005	0,005	0,005
ВОДНАЯ ФАЗА	40,00	39,80	40,00
Вода	40,00	39,80	40,00
ИТОГО	100	100	100

Жирнокислотный состав всех рецептов специализированного липидного модуля удовлетворяет медико-биологическим требованиям, предъявляемым к продукту. В качестве обобщающего примера, в таблице 11 приведен жирнокислотный состав жирового компонента липидного модуля, выработанного по рецептуре №4.

Таблица 11 – Жирнокислотный состав жирового компонента рецептуры №4

Жирная кислота	Формула	Содержание
Капроновая (Гексановая)	6:0	0.022
Каприловая (Октановая)	8:0	0.457
Каприновая (Декановая)	10:0	0.466
Лауриновая (Додекановая)	12:0	3.335
Миристиновая (Тетрадекановая)	14:0	1.817
Пальмитиновая (Гексадекановая)	16:0	4.344
Пальмитолеиновая (Гексадеценная)	16:1 ω 7	0.233
Маргаритиновая (Гептадекановая)	17:0	0.044
Гептадеценная	17:1 ω 8	0.044
Стеариновая (Октадекановая)	18:0	4.233
Олеиновая (Октадеценная)	18:1 ω 9	74.396
Линолевая (Октадекадиенная)	18:2 ω 6	8.594
α -Линоленовая (Октадекатриенная)	18:3 ω 3	0.139
Арахидиновая (Эйкозановая)	20:0	0.317
Эйкозеновая (Гондоиновая)	20:1 ω 9	0.273
Эйкозодиенная	20:2 ω 6	0.000
Бегеновая (Докозановая)	22:0	0.932
Эруковая (Доказеновая)	22:1 ω 13	0.133
Докозодиенная	22:2 ω 6	0.000
Лигноцеритиновая (Тетракозановая)	24:0	0.222
Нервоновая (Тетракозеновая)	24:1 ω 9	0.005
Докозагексаенная	22:6 ω 3	3.050

Концентрация многих минорных биологически активных компонентов, таких как токоферолы, каротиноиды и фосфолипиды, также существенно

зависит от условий окружающей среды [225]. Однако, содержание минорных компонентов достаточно легко варьировать в зависимости от конкретного типа используемой жировой основы, благодаря их высокой концентрации в коммерческих препаратах, в связи с чем, включение расчета концентрации минорных компонентов не представляется необходимым. Для обоих продуктов расчет концентрации минорных компонентов для антиоксидантной защиты осуществляли автоматически на основании корреляционных уравнений, обобщенных в базе данных.

Результаты научно-исследовательских и технологических работ были внедрены в производственную практику (акты внедрения см. Приложение В), также подана заявка на патент РФ на изобретение (см. Приложение Г) в рамках работ по гранту РФФИ (проект № 14-16-00055).

4.2 Анализ гигиенических показателей качества и безопасности при окислении дисперсных жировых продуктов

На втором этапе диссертационной работы было проведено исследование индикаторов гигиенических рисков при окислении дисперсных жировых продуктов.

Целью исследований являлось установление влияния дисперсных форм антиоксидантов на значения гигиенических показателей перекисного и кислотного чисел.

В качестве объектов исследования были использованы мицеллированные антиоксиданты фирмы NovaSol, среди которых мицеллированные формы масла семян чиа (NutrizellChia), полифенолов какао (Cacaopoly), экстракта розмарина (Rosemary), витамина Е (E), а также смеси витаминов Е и С (COF). Характеристика коммерческих образцов антиоксидантов представлена в разделе 3.1.2.

Для достижения поставленной цели было проведено измерение значения перекисного и кислотного чисел для образцов мицеллированных антиоксидантов (см. рис. 7).

Результаты исследований наглядно демонстрируют, что значения перекисных и кислотных чисел для образцов антиоксидантов существенно превышают допустимые нормативы для масел и жиров.

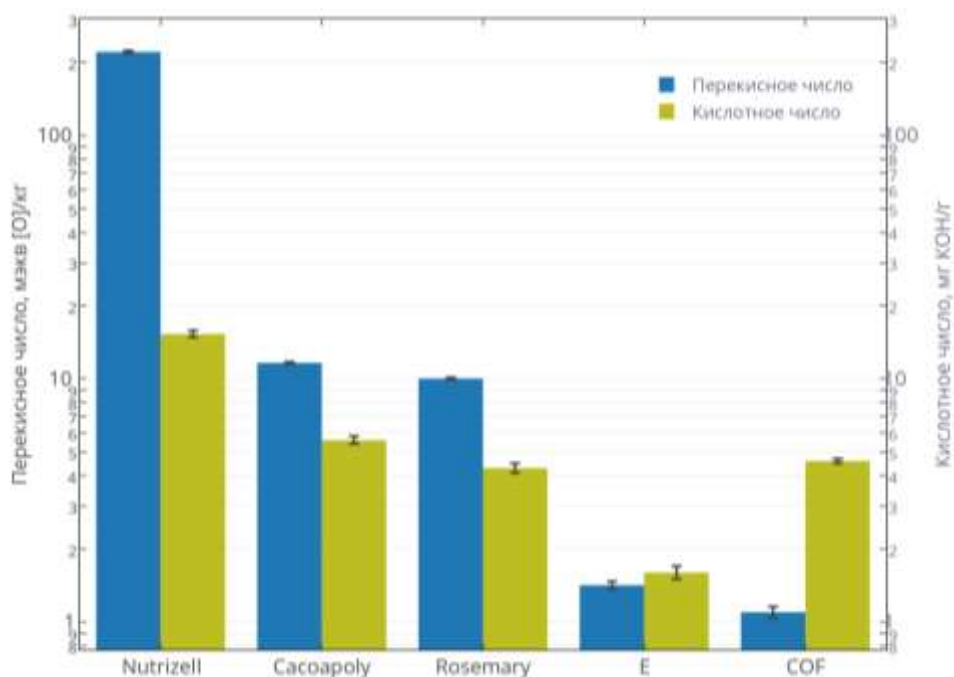


Рисунок 7. Значения перекисных и кислотных чисел мицеллированных антиоксидантов

Наибольшие значения перекисного и кислотного чисел отмечены у образца антиоксиданта Nutrizell, значение перекисного числа которого превышает 200 мэкв [O]/кг при допустимом значении, равном 10 мэкв [O]/кг, а значение кислотного числа – 11 мг КОН/г при допустимом значении, равном 0.6-2 мг КОН/г.

Высокое значение кислотного числа с учетом условий эксперимента объясняется, в первую очередь, химической природой активных компонентов антиоксидантов, имеющих кислую среду (аскорбиновая кислота, полифенолы какао, розмариновая кислота) и в значительно меньшей степени

отображает степень гидролитической порчи липидов, входящих в состав антиоксидантов.

Высокое значение перекисного числа образцов может иметь несколько объяснений. В рамках диссертационной работы выдвинуто две гипотезы: первая заключается в том, что в образцах антиоксидантов в процессе их производства могут иметь место нарушения, приводящие к накоплению продуктов перекисного окисления липидов, которые отвечают за высокие значения перекисного числа; вторая гипотеза состоит в том, что при диспергировании антиоксидантов до мицелл со средним размером 30 нм значительную роль играют процессы диффузии молекулярного кислорода в водную фазу антиоксиданта вследствие значительного увеличения площади поверхности фаз.

Для установления значимости полученных данных при использовании мицеллированных антиоксидантов в маслах при рекомендованных производителем концентрациях был поставлен следующий эксперимент.

Контрольный образец подсолнечного масла без антиоксидантов и образцы подсолнечного масла с внесенными антиоксидантами в мицеллярной форме в концентрациях от 0,005 до 0,04 % масс. хранили в течение 24 часов в термостате при постоянной температуре 60 °С, при этом проводили измерение перекисного числа в нулевой точке (сразу после внесения антиоксиданта) и в конце эксперимента (рис. 8).

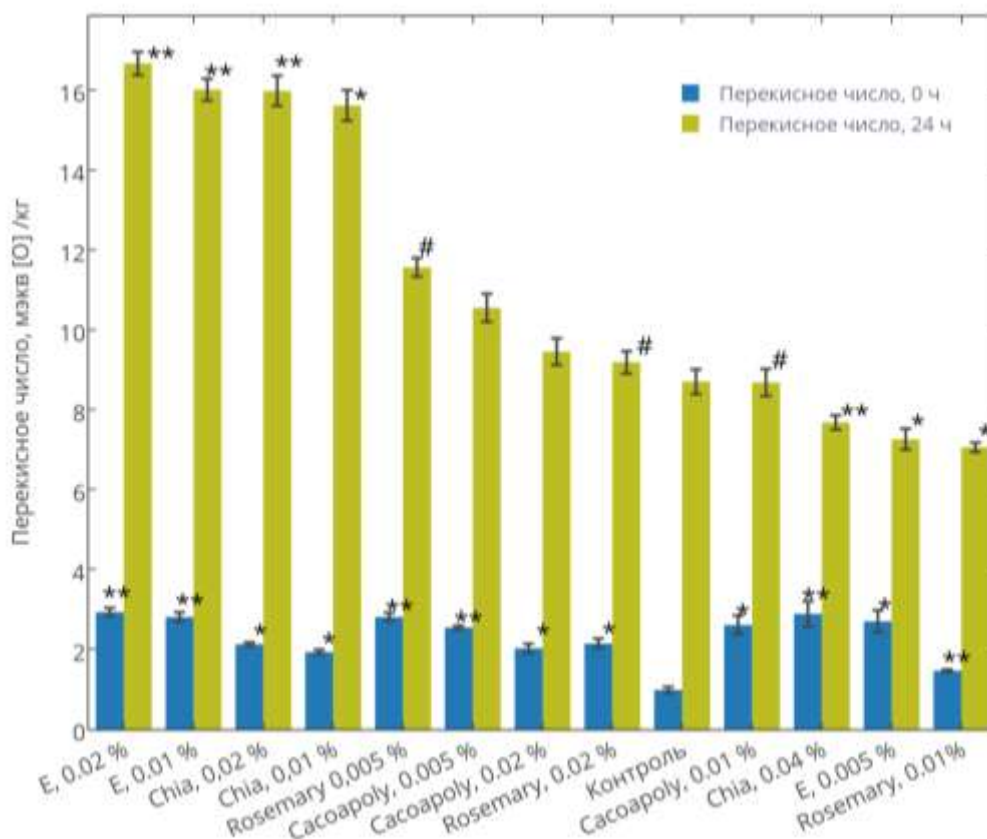


Рисунок 8. Значения перекисных чисел образцов подсолнечного масла с внесенными антиоксидантами в мицеллярной форме сразу после внесения и спустя 24 часа после хранения при температуре 60 °С (# – $p < 0.05$, * – $p < 0.01$, ** – $p < 0.001$)

Аналогичные результаты получены Yang и Xiong в 2015 году по исследованию окислительных процессов в эмульсиях [226]. Ими было показано увеличение тиобарбитурового числа и содержания конъюгированных диенов в эмульсиях, эмульгатором в которых в качестве эмульгатора также был использован полисорбат (Твин 20).

Повышение значения перекисного числа в нулевой точке было статистически достоверным ($p < 0.01$) для всех образцов подсолнечного масла с антиоксидантами по сравнению с контрольным образцом. При этом спустя 24 часа хранения, значение перекисного числа для большинства образцов было существенно выше, чем в контрольном образце, что в теории указывает на более интенсивное накопление продуктов перекисного окисления липидов.

Примечательным является тот факт, что подобный проокислительный эффект, как правило, наблюдался для образцов масел с более высокой концентрацией антиоксидантов.

Однако, если допустить, что высокие значения перекисного числа в нулевой точке – следствие более высокой концентрации кислорода, а не продуктов перекисного окисления, то с учетом разницы значений перекисных чисел в нулевой точке результаты приобретают иной характер. Так, к образцам, имеющим достоверно более низкие значения перекисного числа (0,04% Chia, 0,005% витамина Е и 0.01% Rosemary) добавляются образцы с 0,02% экстрактом розмарина и 0,01% полифенолов какао; образцы с 0,005% и 0,02% полифенолов какао не имеют достоверных отличий от контрольного образца.

Высокое содержание молекулярного кислорода в образцах мицеллярных антиоксидантов может быть обусловлено следующими факторами:

1. Диффузия кислорода на границе вода/масло

В силу того, что кислород в три раза более растворим в жировой фазе, чем в воде, в эмульсиях он всегда присутствует в значительных количествах, накапливаясь в жировой фазе [227,228].

2. Высокая степень диффузии кислорода за счет большой площади поверхности контакта фаз в наноразмерных мицеллах:

В соответствии с общим законом диффузии (закон Фика),

$$\delta m = D \frac{dc}{dt} dS dt$$

количество вещества δm , диффундирующее за промежуток времени dt через площадку dS , нормальную к той линии l , вдоль которой происходит диффузия, пропорционально площади контакта фаз dS .

Площадь контакта фаз в эмульсиях напрямую зависит от диаметра частиц дисперсной фазы и драматически увеличивается с уменьшением диаметра частиц до размера мицелл исследуемых антиоксидантов. Например,

удельная площадь поверхности частиц дисперсной фазы в молоке (диаметр частиц порядка 4 мкм) и удельная площадь поверхности раствора мицелл антиоксидантов (диаметр частиц порядка 30 нм) отличаются на три порядка с пропорциональной разницей в количестве кислорода, диффузирующего на границе раздела фаз.

Таким образом, установлено, что вклад мицеллярных антиоксидантов в технологически значимых концентрациях является статистически значимым, тем не менее, причина повышения значения перекисного числа требует дополнительного изучения.

4.3 Разработка принципа дифференциальной оценки развития процессов перекисного окисления липидов

Для установления истинной причины повышения значений перекисного числа в образцах масел с мицеллярными антиоксидантами был поставлен эксперимент, целью которого являлась дифференциация фактора, влияющего на значения перекисного числа.

Для достижения поставленной цели, достаточно исключить один из возможных факторов воздействия, то есть перекисные соединения или молекулярный кислород. В силу того, что исключение продуктов перекисного окисления липидов не представляется возможным, был поставлен эксперимент, исключающий возможное влияние молекулярного кислорода из образцов антиоксидантов.

Осуществление данной задачи возможно при условии, если кислород в реакционной среде будет находиться в большом избытке, таким образом, окисление будет протекать подобно реакции нулевого порядка, то есть независимо от концентрации кислорода.

В связи с этим, для установления причины высоких значений перекисного числа в образцах, в качестве дифференцирующего показателя было использовано значение прямого потребления молекулярного кислорода продуктом.

Потребление кислорода образцом продукта определяется по изменению давления в камере реактора OXITEST (рис. 9). При этом для всех жировых продуктов характерным является наличие периода индукции окислительных процессов, после которого следует резкое падение давления, и, следовательно, интенсификация процессов окислительной порчи.

Продолжительность периода индукции характеризует окислительную стабильность образца жирового продукта.

Как видно из рисунка 9, начальное давление кислорода в камере реактора составляет порядка 6 бар, что достаточно для протекания окислительных процессов как реакции нулевого порядка.

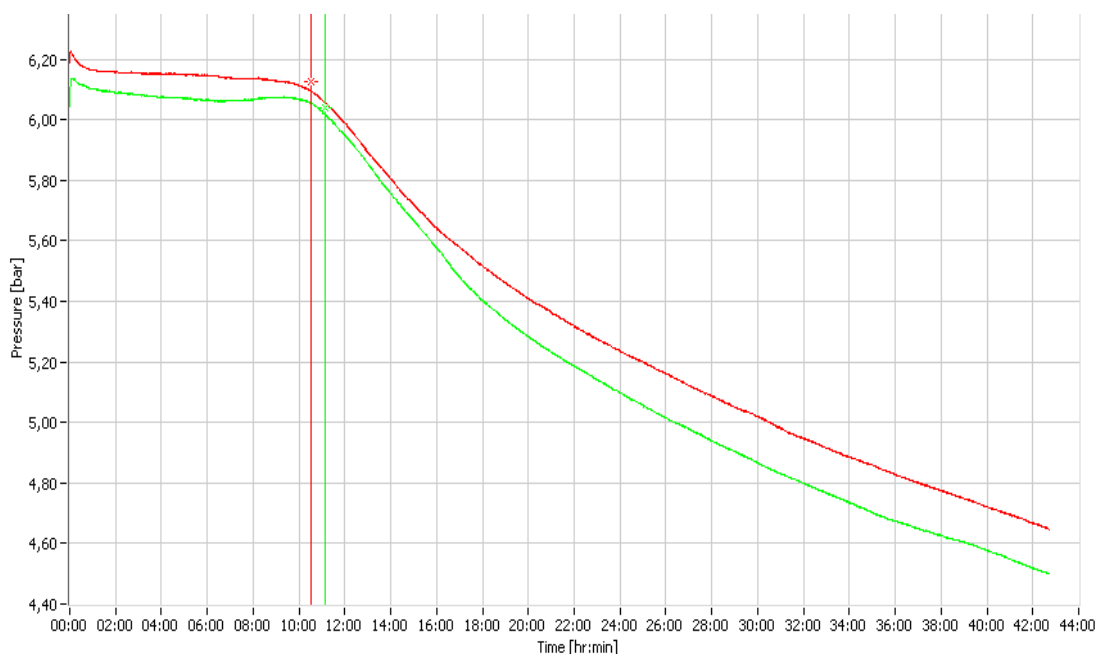


Рисунок 9 – Типичная кривая падения давления кислорода в камере реактора; вертикальной линией обозначено окончание периода индукции образцов (сливочное масло)

Для установления соответствия динамики накопления продуктов окисления липидов при нормальных условиях и при избытке кислорода, образцы жировых продуктов до и после окисления в камере реактора были проанализированы методом ИК-спектроскопии с преобразованиями Фурье на модели соевого масла с внесенным витамином Е в мицеллярной форме (рис. 10). Выбор в качестве модельного образца соевого масла обусловлен его относительно низкой окислительной устойчивостью и как следствие более коротким временем проведения эксперимента.

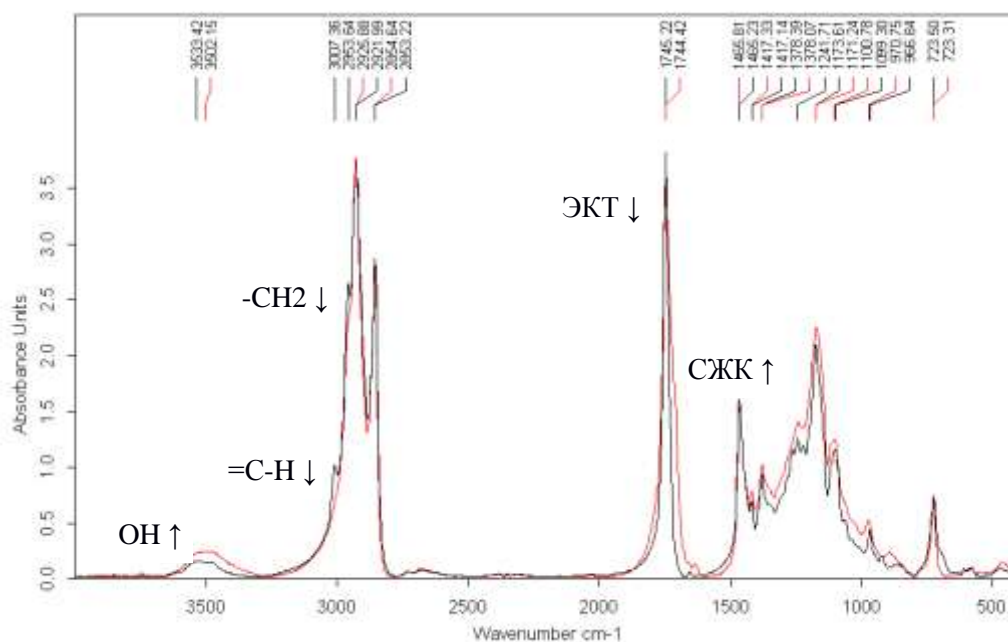


Рисунок 10 – ИК-спектры соевого масла с дисперсной формой витамина Е до (обозначено черным цветом) и после (обозначено красным цветом) окисления в камере реактора. Рядом с пиками указана динамика в содержании соответствующих функциональных групп, ответственных за изменения спектров (СЖК – свободные жирные кислоты, ЭКТ – эфирный карбонил триглицеридов)

Анализ ИК-спектров образца масла до и после окисления в камере реактора позволяет сделать вывод о следующей динамике окислительных процессов.

1. В образце масла до окисления отмечена широкая полоса поглощения в области 3533 см^{-1} , соответствующая колебаниям О-Н связи фенольной группы токоферола. После окисления отмечено увеличение данной полосы поглощения и смещение ее до 3502 см^{-1} , что свидетельствует о накоплении О-Н связей не из фенольной группы в образце масла. Предположительно, данное смещение обусловлено накоплением О-Н связей за счет образования перекисных соединений.
2. Существенное снижение узкой полосы поглощения в области 1745 см^{-1} , соответствующей колебаниям эфирного карбонила триглицеридов, на фоне ее расширения в сторону 1500 см^{-1} , соответствует повышению содержания свободных жирных кислот. В совокупности, данные изменения свидетельствуют о накоплении продуктов гидролитической порчи триглицеридов.

3. Практически полное отсутствие полосы поглощения в области 3007 см^{-1} , соответствующей колебаниям С-Н групп при двойной связи, а также полосы поглощения в области 2953 см^{-1} , соответствующей асимметрическим колебаниям CH_2 группы, свидетельствует об образовании вторичных продуктов окисления предположительно в результате реакции присоединения пероксидного R-OO^\bullet и гидроксильного R-O^\bullet радикала к углероду при двойной связи (рис. 11).

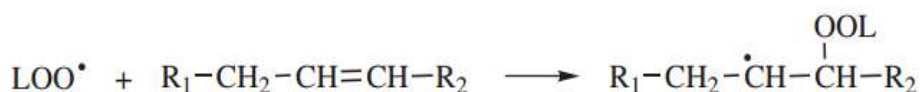


Рисунок 11 – Реакция присоединения пероксидного радикала по двойной связи

4. Отмечено отсутствие значительных изменений в содержании транс-изомеров жирных кислот в результате термической изомеризации, а также в образовании циклических продуктов окисления липидов.

Результаты исследования образцов до и после окисления в камере реактора свидетельствуют о соответствии динамики накопления продуктов окисления липидов при избытке кислорода общепринятым представлениям о динамике накопления продуктов окисления при нормальных условиях.

Принимая во внимание сопоставимость протекающих реакций в обоих условиях, сделан вывод о возможности сравнения результатов измерений при хранении и при окислении в избытке кислорода.

Для исследования были подготовлены образцы подсолнечного масла, содержащие антиоксиданты NovaSolCOF (0,005%), d- α -Токоферол (0,005%) в виде растворов (не в дисперсной форме), NovaSolRosemary (0,01%), NovaSolCacoapoly (0,01%), NovaSolE (0,005%), NovaSolNutrizellChia (0,04%), и контрольный образец, не содержащий антиоксидант. Оба исследования проводили при $80\text{ }^\circ\text{C}$. В первом эксперименте образцы подсолнечного масла хранили в течение 6 суток с периодическим отбором проб для измерения перекисного, кислотного и анизидинового чисел, во втором эксперименте

образцы подсолнечного масла загружали в окислительную камеру с избытком кислорода для определения периода индукции (Рис. 9).

На основании результатов исследований были определены метрологические характеристики метода измерения периода индукции жировых продуктов (табл. 12).

Таблица 12 – Метрологическая характеристика метода измерения периода индукции жировых продуктов

Метрологическая характеристика ($P = 95 \%$)	Диапазон измерений, ч	
	от 10 до 60.	св. 60 до 160 включ.
Предел повторяемости r	0,25	0,5
Предел воспроизводимости R	0,5	1
Показатель точности (границы абсолютной погрешности) $\pm\Delta$	0,3	0,7

В качестве критерия активности антиоксиданта использовали значение относительной стабильности, рассчитываемое по формуле (1):

$$OC = \frac{\text{Период индукции масла с антиоксидантом}}{\text{Период индукции контрольного образца}} \quad (1)$$

, где OC – относительная стабильность.

Результаты исследований представлены на рис.12. Как видно из рисунка, образец подсолнечного масла с внесенным d- α -Токоферолом по значениям перекисного, кислотного и анизидинового чисел во всех случаях достоверно проявляет антиоксидантные свойства, замедляя процессы накопления продуктов окислительной и гидролитической порчи.

При измерении содержания продуктов перекисного окисления отмечен существенный разброс начальных значений перекисного числа между образцами масел. Статистически значимый антиоксидантный эффект по результатам данных измерений проявили антиоксиданты COF и d- α -Токоферол.

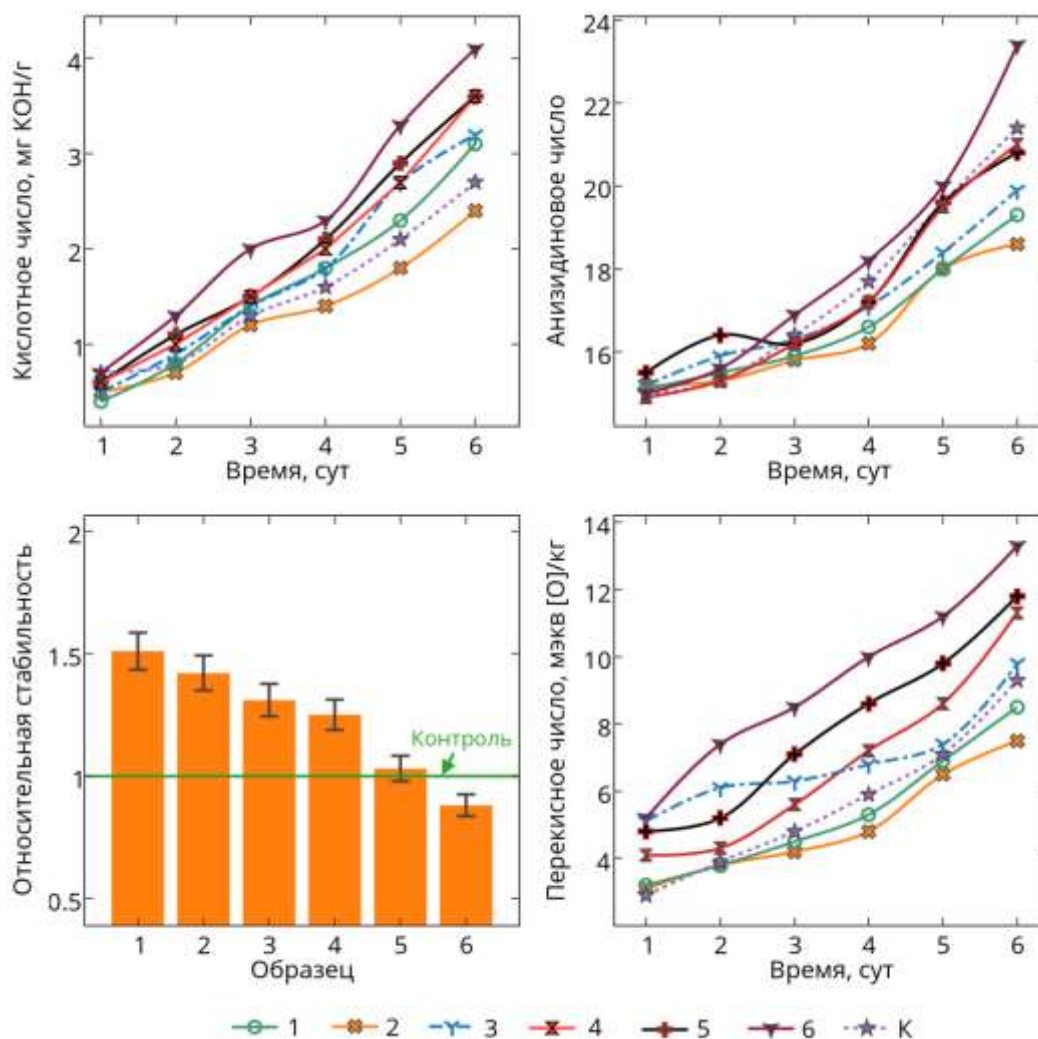


Рисунок 12 – Значения относительной стабильности, перекисных, кислотных и анизидиновых чисел образцов подсолнечного масла (К – контрольный образец без антиоксиданта, образцы 1-6 – подсолнечное масло с внесенными антиоксидантами NovaSol COF, d- α -Токоферол, NovaSol Rosemary, NovaSol Cacoapoly, NovaSol E, NovaSol Nutrizell Chia соответственно)

При измерении содержания продуктов гидролитической порчи разброс начальных значений кислотного числа между образцами масел незначителен. При измерении содержания продуктов окислительной порчи статистически значимый антиоксидантный эффект по результатам данных измерений проявил антиоксидант d- α -Токоферол.

При измерении анизидинового числа образцов масел достоверное снижение этого показателя отмечено в образцах масел с антиоксидантами NovaSol COF, d- α -Токоферол, NovaSol Rosemary.

Результаты эксперимента при окислении в избытке кислорода свидетельствуют о достоверном антиоксидантном эффекте образцов в маслах с антиоксидантами NovaSol COF, d- α -Токоферол, NovaSol Rosemary, NovaSol Cacaoapoly, индифферентном эффекте в образце масла с антиоксидантом NovaSol E и прооксидантом эффекте в образце масла с антиоксидантом NovaSol Nutrizell Chia.

Анализируя результаты исследований в обоих экспериментах, сделан вывод о том, что высокие значения перекисного числа в образцах масел с антиоксидантами NovaSol COF, NovaSol Rosemary, NovaSol Cacaoapoly и NovaSol E связаны не с высоким содержанием продуктов перекисного окисления липидов, а с присутствием молекулярного кислорода в водной фазе антиоксидантов. Для образца антиоксиданта NovaSol Nutrizell Chia высокие значения перекисного числа связаны, очевидно, с содержанием продуктов перекисного окисления.

Таким образом, показано, что при использовании дисперсных форм антиоксидантов имеют место завышенные результаты измерений перекисного числа в масле за счет присутствия в мицелле молекулярного кислорода. В связи с этим, целесообразным при изучении дисперсных жировых продуктов является определение их периода индукции как интегрального показателя окислительной стабильности.

Результаты исследований по пункту 4.3 диссертационной работы оформлены в виде результатов НИОКР по темам: *«Исследование устойчивости к окислению масел с использованием мицеллярных антиоксидантов»* и *«Исследование эффективности использования природных антиокислителей»*.

4.4 Анализ индикаторов для оценки гигиенических рисков при использовании фритюрных жиров

Для выявления наиболее значимых индикаторов, процессы жарки во фритюре были воспроизведены в трех вариантах: периодическая жарка в

лабораторных условиях, периодическая жарка в условиях предприятий общественного питания, и непрерывная жарка в условиях производства снековой продукции (чипсов).

Условия проведения экспериментов представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Режимы жарки и контролируемые показатели

Тип процесса	Продолжительность эксперимента	Факторы выработки	Контролируемые показатели
Жарка в условиях предприятия общественного питания	≈ 5 дней	5 предприятий 1 тип масла 5 типов продукции 1 режим жарки	1. Перекисное число 2. Кислотное число 3. Общие полярные вещества
Жарка в лабораторных условиях	21 ч	1 лаборатория 2 типа масла 1 тип продукции 2 режима жарки	2. Кислотное число 3. Общие полярные вещества 4. Показатель преломления 5. Коэффициент экстинкции 6. Тест-полоски 7. Реакция с метиленовым голубым 8. Органолептическая оценка
Жарка в условиях производства снековой продукции	41 ч	1 предприятие 1 тип масла 1 тип продукции 1 режим жарки	1. Показатель преломления

Как видно из табл. 13, эксперименты отличались как по продолжительности опыта, так и по факторам выработки и контролируемым показателям. Последние отличия связаны с тем, что описанные эксперименты выполняли не с целью сравнения результатов между тремя условиями, а с целью получения недостающей информации по каждому из условий.

Например, только в условиях предприятия общественного питания представляется возможным достоверное воспроизведение режимов периодической жарки, при этом аппаратное обеспечение позволяет проводить параллельную жарку различных пищевых продуктов, таких как картофель, курица, рыба, кондитерские изделия. Использование различных

типов продуктов для жарки позволяет учесть фактор влияния компонентов обжариваемого продукта на результаты измерений гигиенических показателей.

В эксперименте в условиях предприятий общественного питания имеются существенные ограничения в частоте отбора проб масел, методах контроля качества, типах применяемых масел, скорости и количестве загружаемого продукта в объем масла.

В связи с этим, в дополнение к эксперименту в данных условиях, были проведены лабораторные исследования с целью расширения методов контроля, режимов жарки и типов применяемых масел. Контролируемыми показателями качества и безопасности фритюрных жиров при лабораторной выработке являлись: кислотное число, содержание общих полярных веществ, показатель преломления, коэффициент экстинкции, реакция тест-полосок, реакция с метиленовым голубым и органолептическая оценка. При этом, было использовано два типа масла и два режима жарки, отличающиеся по содержанию влаги в системе.

Жарка в условиях производства снековой продукции имеет ряд ограничений в применимости различных методов анализа во многом в силу невозможности проведения измерений непосредственно в объеме масла.

На первом этапе исследований была осуществлена жарка пищевых продуктов в условиях предприятий общественного питания. Обжаривание продуктов проводили до достижения содержания общих полярных веществ равным 25 %. При этом отбор проб проводили трижды в день, параллельно измеряя значения кислотного и перекисного чисел.

В таблице 14 представлены статистические данные по продолжительности использования фритюрного жира до момента его замены в отдельных ресторанах города Москвы.

Таблица 14 – Среднее фактическое количество дней использования фритюрного жира, после которых рестораны производят его замену, дней

Ресторан	Обжариваемый продукт				
	Картофель фри	Картофель по-деревенски	Курица	Рыбное филе	Пироги
ТЦ Юго-Запад	4,0	5,5	6,0	3,0	6,0
Раменки	5,0	5,5	3,5	4,5	4,0
Люблинка 66	4,0	5,0	4,5	4,5	4,5
Серпуховка	6,0	7,0	4,5	4,0	6,0
Марьино	6,0	5,0	5,0	5,0	5,5
Среднее	5,0	5,6	4,7	4,2	5,2

Дисперсионный анализ данных представленных в таблице 14 показывает, что продолжительность жарки до достижения значения содержания общих полярных веществ, равного 25 %, в большей степени варьирует в зависимости от типа обжариваемого продукта, чем от предприятия общественного питания (табл. 15).

Таблица 15 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа продолжительности использования фритюрного масла

Источник вариации	SS	df	MS	F	P	F критическое
Между групп продуктов	6,672	4	1,668	2,6730	0,05537	2,7587
Внутри групп продуктов	15,6	25	0,624			
Итого	22,272	29				
Между групп ресторанов	4,16	4	1,04	1,2235	0,33227	2,8660
Внутри групп ресторанов	17	20	0,85			
Итого	21,16	24				

Наименьший период жарки (наибольшая степень развития окислительных, гидролитических и термических процессов) был характерен в случае обжаривания рыбного филе. Наибольший период жарки был отмечен при обжаривании картофеля «по-деревенски»

Один из основных гигиенических показателей, применяемых для оценки безопасности пищевых жиров – перекисное число – за период проведения исследований ни в одном случае не превысил установленных нормативов даже к концу периода жарки (табл. 16).

Таблица 16 – Средний уровень перекисного числа при замене масла, мЭКВ [О]/кг

Ресторан	Картофель фри	Картофель по-деревенски	Курица	Рыбное филе	Пироги
ТЦ Юго-Запад	2,32	1,94	1,90	2,23	2,07
Раменки	2,96	2,67	2,45	1,89	1,87
Люблинка 66	1,62	1,83	2,89	2,16	2,67
Серпуховка	1,84	2,66	2,16	1,88	1,98
Марьино	2,70	3,80	4,70	1,80	2,30
Среднее	2,29	2,58	2,82	1,99	2,18

Принимая во внимание тот факт, что перекисные соединения разрушаются при температуре порядка 120 °С, что существенно ниже температуры при жарке пищевых продуктов (160-180 °С), оценка значений перекисного числа не представляет физического смысла, однако, можно отметить отсутствие статистически достоверных различий между значениями перекисных чисел в группах как между предприятиями, так и в зависимости от обжариваемого продукта.

Оценка изменений гигиенического показателя кислотного числа выявила достоверные различия как в группах предприятий, так и в группах по типу обжариваемого продукта (табл. 17).

Таблица 17 – Средний уровень свободных жирных кислот в масле на его момент замены, мг КОН/г

Ресторан	Картофель фри	Картофель по-деревенски	Курица	Рыбное филе	Пироги
ТЦ Юго-Запад	1,32	2,80	2,68	1,75	2,90
Раменки	1,26	1,94	3,16	2,96	2,32
Люблинка 66	1,44	2,03	1,46	1,34	2,56
Серпуховка	1,27	2,36	2,20	1,78	2,84
Марьино	1,90	3,00	2,10	2,30	2,70
Среднее	1,44	2,43	2,32	2,03	2,66

Как видно из данных таблицы 17, за время проведения эксперимента наибольшее значение кислотного числа наблюдалось при обжарке пирогов, однако, с учетом различий во времени проведения эксперимента (табл. 14), наибольшая скорость развития гидролитических процессов может быть

констатирована при обжарке курицы и рыбного филе. При этом, при обжарке всех типов продуктов, кроме картофеля фри, отмечено превышение кислотного числа нормируемого значения.

Отличными от представленных данных являются результаты, полученные при изучении содержания общих полярных веществ (табл. 18).

Таблица 18 – Средний уровень полярных соединений в масле на момент его замены масла, %

Ресторан	Картофель фри	Картофель по-деревенски	Курица	Рыбное филе	Пироги
ТЦ Юго-Запад	25,50	26,50	27,00	23,50	23,00
Раменки	24,50	28,00	29,50	27,00	23,50
Люблинка 66	24,50	26,00	25,00	23,50	27,00
Серпуховка	26,00	21,50	23,50	23,00	26,50
Марьино	28,50	22,50	25,00	25,00	26,50
Среднее	25,20	25,10	26,00	24,40	24,90

Важно отметить, что при достижении содержания общих полярных веществ значения 25 %, не во всех случаях наблюдается достижение кислотным числом значения 2 мг КОН/г, равно как и наоборот – при достижении кислотного числа значения 2 мг КОН/г не во всех случаях наблюдается превышение принятых значений ОПВ.

Как показано в таблице 18, даже при установленном требовании достижения значения содержания общих полярных веществ (ОПВ) в 25 %, имеют место существенные различия между конечными значениями содержания общих полярных веществ.

Данный факт свидетельствует о нецелесообразности использования верхних допустимых значений ОПВ при контроле качества и безопасности фритюрных жиров в условиях предприятий общественного питания.

Более полное представление о протекающих при жарке пищевых продуктов процессах возможно при условии расширения набора методов, применяемых для оценки безопасности фритюрного жира, изучении влияния типа масла и режимов жарки на динамику накопления продуктов термической, окислительной и гидролитической порчи.

Данные исследования были проведены на следующем этапе работ в рамках лабораторной жарки пищевых продуктов.

На данном этапе в лабораторных условиях были воспроизведены процессы жарки картофеля во фритюре в течение 3 дней (8-ми часовая продолжительность ежедневной жарки) согласно процедуре, описанной в разделе объекты и методы исследования.

Отбор проб для исследований изменения показателей окислительной и гидролитической порчи проводился в 9 контрольных точках: 0, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 19 и 21 час после достижения оптимальной для жарки температуры (170 °С). В табл. 19 приведены результаты органолептической оценки фритюрных жиров.

Таблица 19 – Средние баллы при органолептической оценке качества фритюрных жиров

Время жарки, ч	Средний балл			
	Содержание влаги 7%		Содержание влаги 11%	
	01-02	05-09	01-02	05-09
0	5	5	5	5
3	5	5	5	5
5	4	4	4	4
7	4	3	4	3
9	3	2	3	2
11	2	2	2	2
14	2	2	2	2
19	2	2	2	2
21	2	2	2	2

Заштрихованной областью обозначены образцы масел, получившие неудовлетворительную оценку по результатам органолептического анализа

Согласно данным табл. 15, по органолептическим показателям в обеих параллелях качество масла 01-02 считается неудовлетворительным спустя 11 часов после начала жарки, а качество масла 05-09 – спустя 9 часов.

На рис. 13-20 в графическом виде приведены результаты измерений показателей порчи масла в процессе жарки. Красным цветом на графиках

заштрихована область, в которой согласно методу измерения используемое масло считается непригодным для дальнейшего применения.

На рис. 13 приведена динамика изменения анизидинового числа во время жарки картофеля. Как видно из рисунка, уже спустя час после достижения необходимой температуры, значение анизидинового числа превышает норматив, равный 3 (для рафинированного дезодорированного подсолнечного масла).

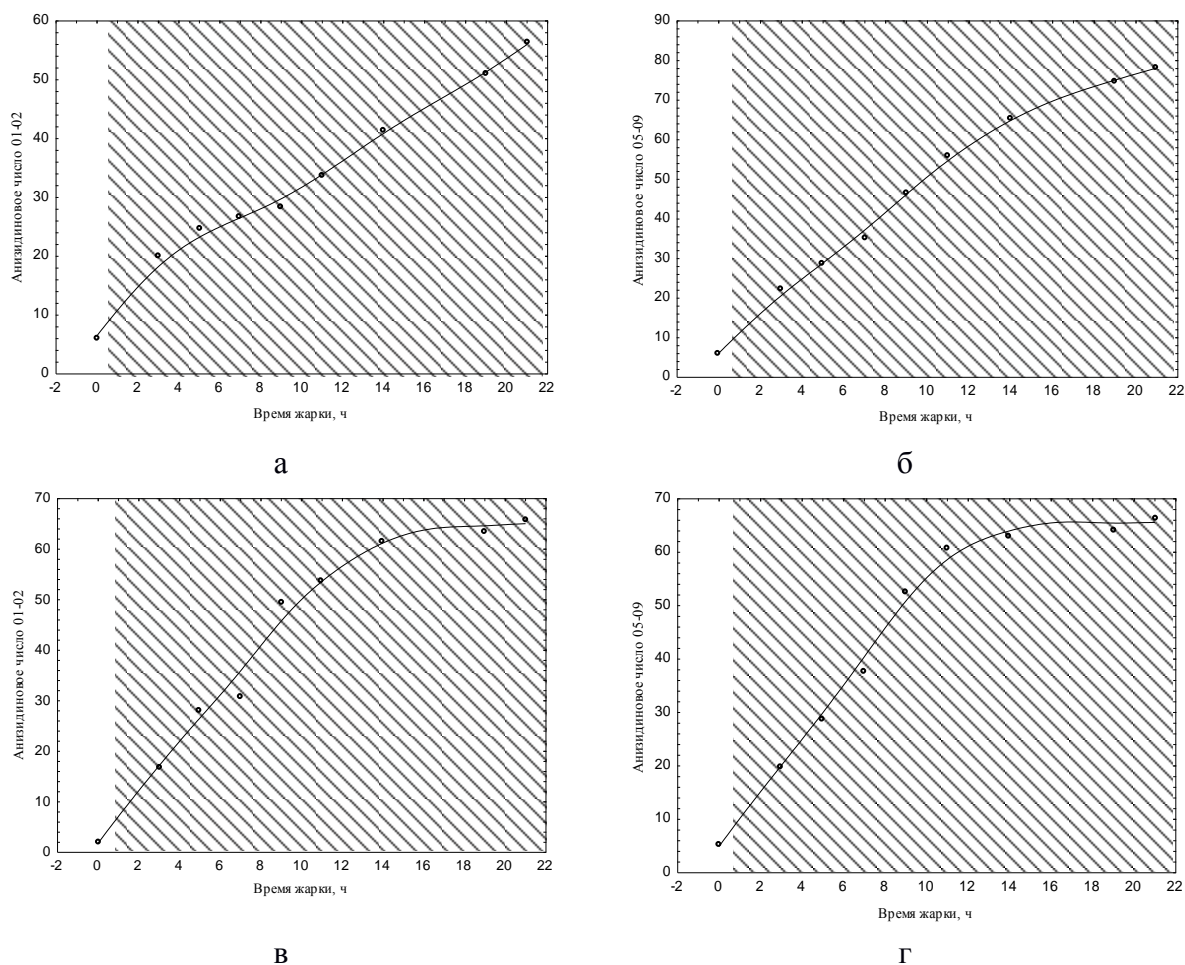


Рисунок 13 – Динамика анизидинового числа во время жарки картофеля (при содержании влаги 7%: а – масло 01-02, б – масло 05-09; при содержании влаги 11%: в – масло 01-02, г – масло 05-09)

Резкое повышение показателя анизидинового числа на фоне сохранения органолептических характеристик при отсутствии достаточной нормативной базы и токсикологических исследований, обуславливает неадекватность применения данного показателя для исследуемых процессов,

что согласуется с международной практикой оценки качества фритюрных жиров.

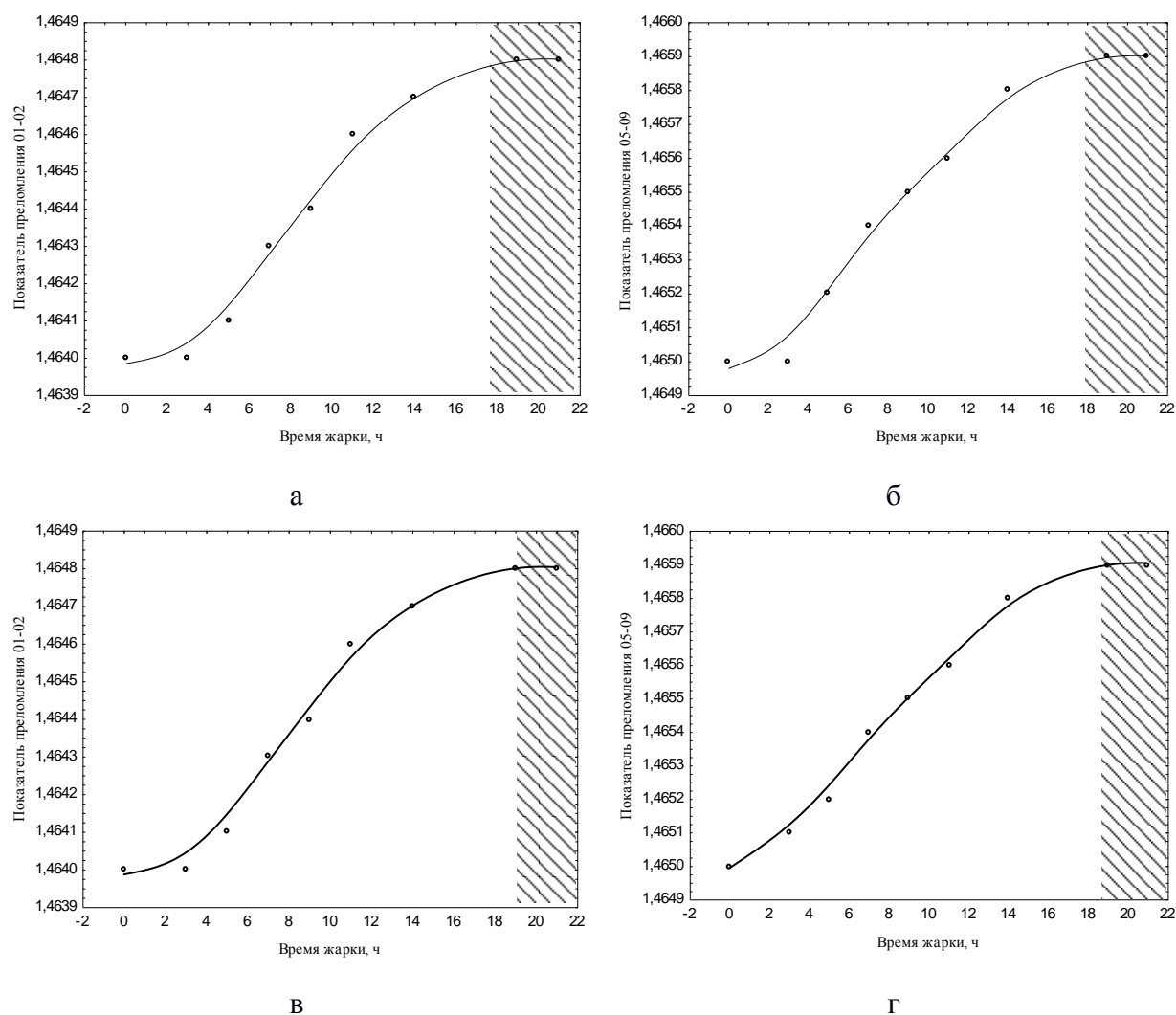


Рисунок 14 – Динамика показателя преломления во время жарки картофеля (при содержании влаги 7%: а – масло 01-02, б – масло 05-09; при содержании влаги 11%: в – масло 01-02, г – масло 05-09)

Также оценивалось изменение ряда физико-химических показателей, которые, согласно санитарным правилам и нормам, действовавшим в СССР и Российской Федерации, являются критичными при оценке качества фритюрных жиров (показатель преломления, кислотное число, коэффициент экстинкции при 232 нм, реакция с метиленовым голубым, тест-полоски, органолептический анализ).

На рис. 14 показано изменение показателя преломления фритюрных жиров в двух параллельных экспериментах с разным содержанием влаги в

системе. При изучении данного показателя (как и для остальных методов в целом) наблюдается тенденция к увеличению устойчивости масла при более высоком содержании влаги. Согласно изменению данного показателя, фритюрный жир считается непригодным спустя 18 ч жарки при содержании влаги 7 % и спустя 19 ч – при содержании влаги 11%.

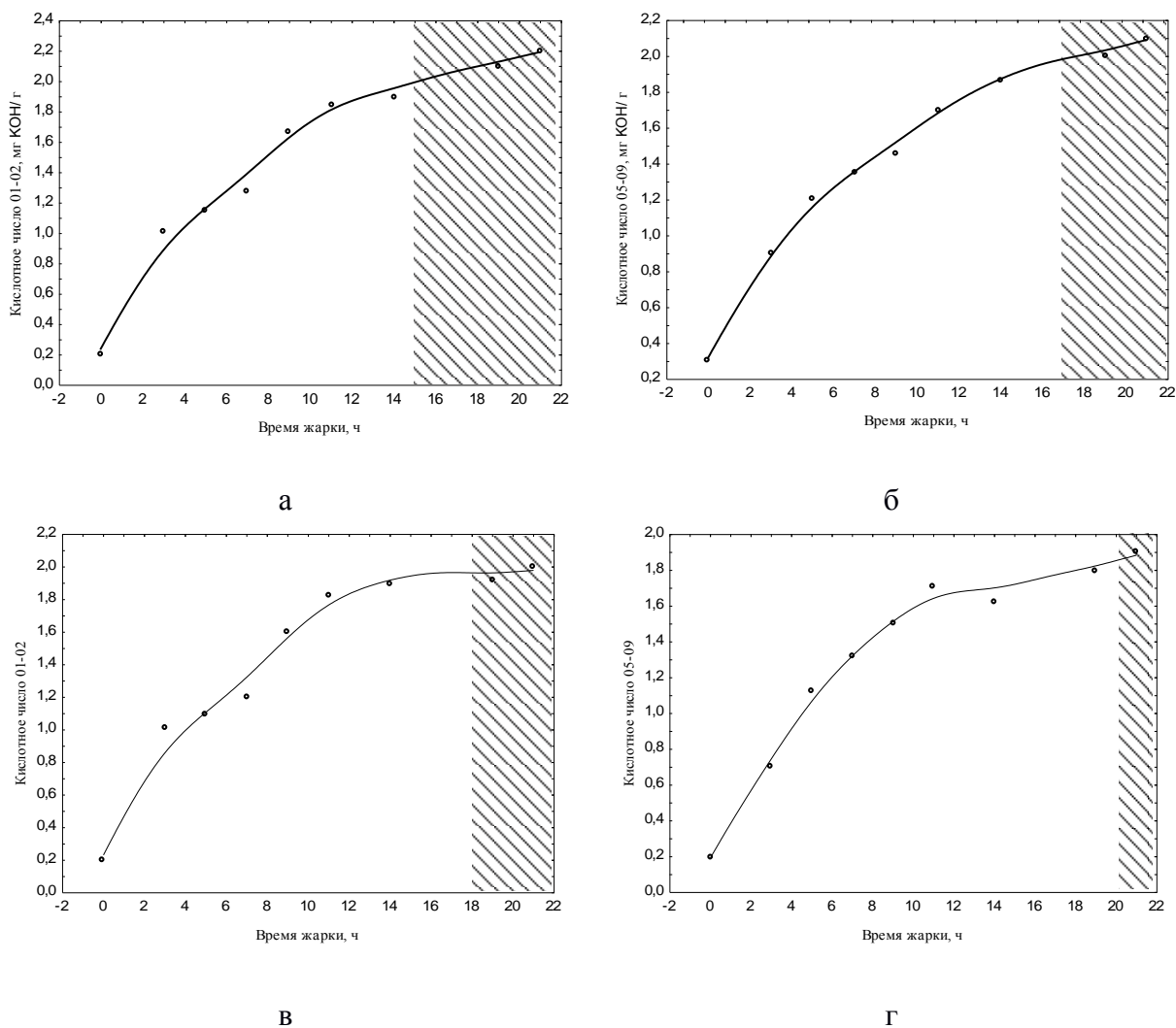


Рисунок 15 – Динамика кислотного числа во время жарки картофеля (при содержании влаги 7%: а – масло 01-02, б – масло 05-09; при содержании влаги 11%: в – масло 01-02, г – масло 05-09)

На рис. 15 показано изменение кислотного числа в процессе жарки. При использовании данного метода заметны различия не только между параллельными экспериментами, но также и внутри параллели. Так в образце 01-02 увеличение кислотного числа, а, следовательно, и развитие гидролитических процессов, протекало интенсивнее, чем в образце 05-09,

что, видимо, связано с разницей в триглицеридном и жирнокислотном составе масел. В системе с содержанием влаги 7% масло считалось непригодным спустя 15 и 17 ч для образцов 01-02 и 05-09 соответственно, а в системе влажностью 11% – спустя соответственно 18 и 20 ч.

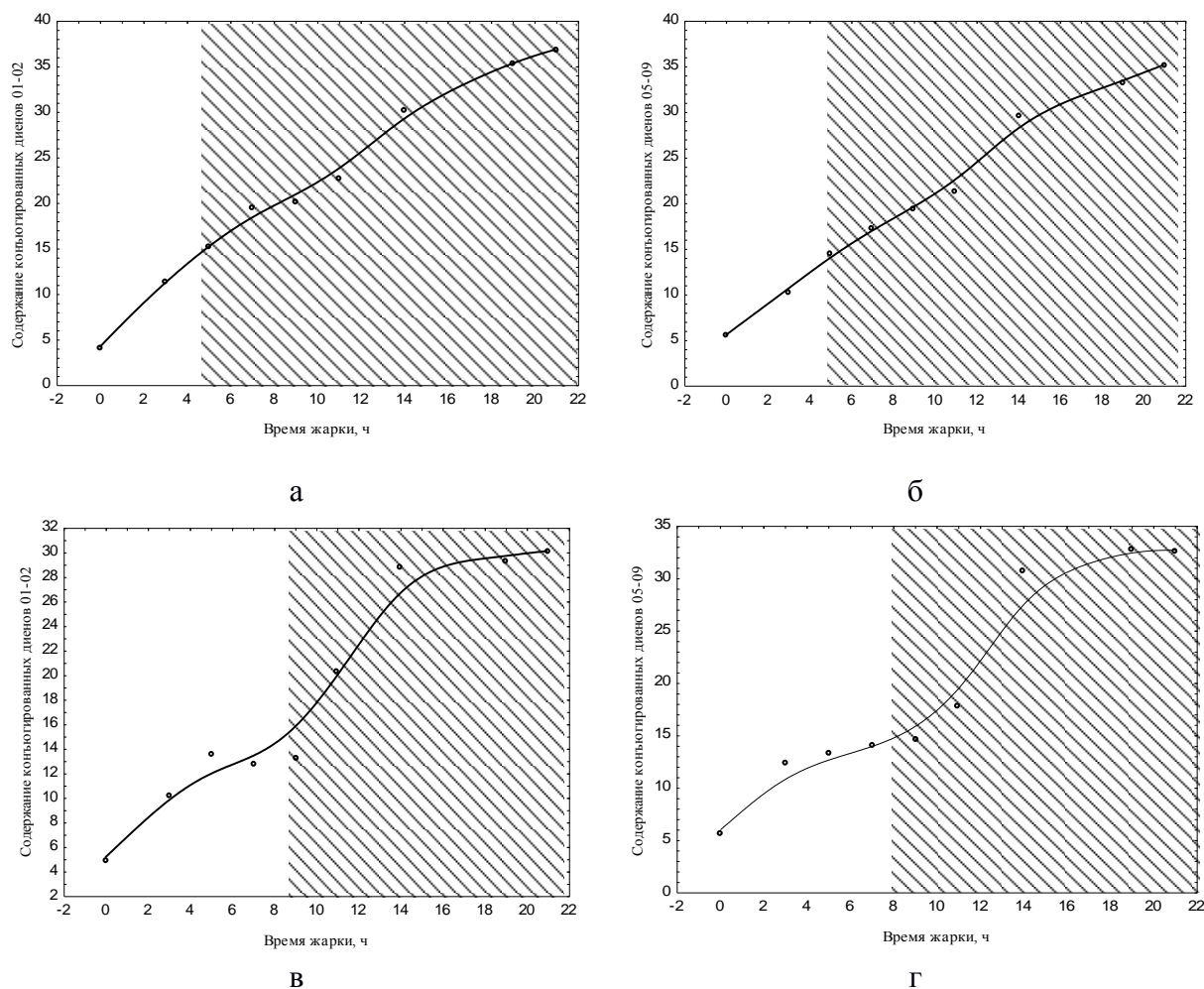


Рисунок 16 – Динамика содержания конъюгированных диенов во время жарки картофеля (при содержании влаги 7%: а – масло 01-02, б – масло 05-09; при содержании влаги 11%: в – масло 01-02, г – масло 05-09)

На рис. 16 отображено изменение коэффициента экстинкции при 232 нм (что соответствует содержанию конъюгированных диенов). Согласно СанПиН, коэффициент экстинкции не должен превышать 15 для фритюрных жиров. При этом в эксперименте с содержанием влаги 7% масло считалось непригодным спустя 5 ч после начала жарки, а в эксперименте с содержанием влаги 11% – 9 и 8 ч для образцов 01-02 и 05-06 соответственно.

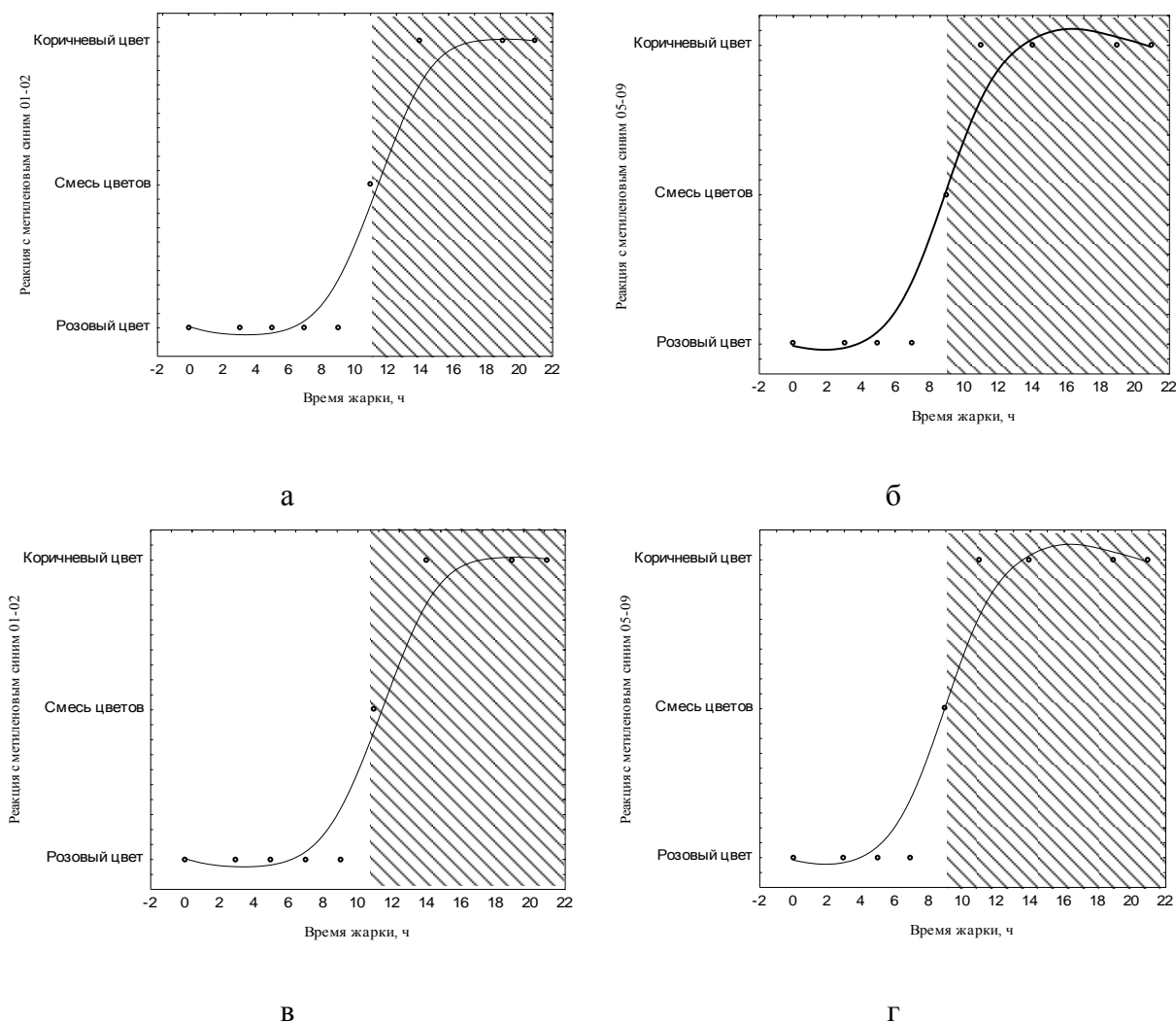


Рисунок 17 – Результаты цветной реакции с метиленовым синим во время жарки картофеля (при содержании влаги 7%: а – масло 01-02, б – масло 05-09; при содержании влаги 11%: в – масло 01-02, г – масло 05-09)

Изменение окраски масла в реакции с метиленовым синим во время жарки приведено на рис. 17. Изменение окраски с розового на коричневый цвет обозначает непригодность масла для дальнейшей жарки. В обеих параллелях масла проявили одинаковую устойчивость: масло 01-02 – 11 ч, а масло 05-09 – 9 ч.

Одним из наиболее часто применяемых методов контроля качества фритюрных жиров в России является использование индикаторных тест-полосок для оценки содержания СЖК. На рис. 18 отображены результаты исследований качества фритюрного жира при помощи тест-полосок ЗМ. Стоит отметить, что данный метод оценивает масло как пригодное для

использования дольше, чем остальные методы исследования. Так, для параллели с содержанием влаги 7% масло считалось непригодным спустя 19 ч, а для параллели с содержанием влаги 11% – спустя 21 ч.

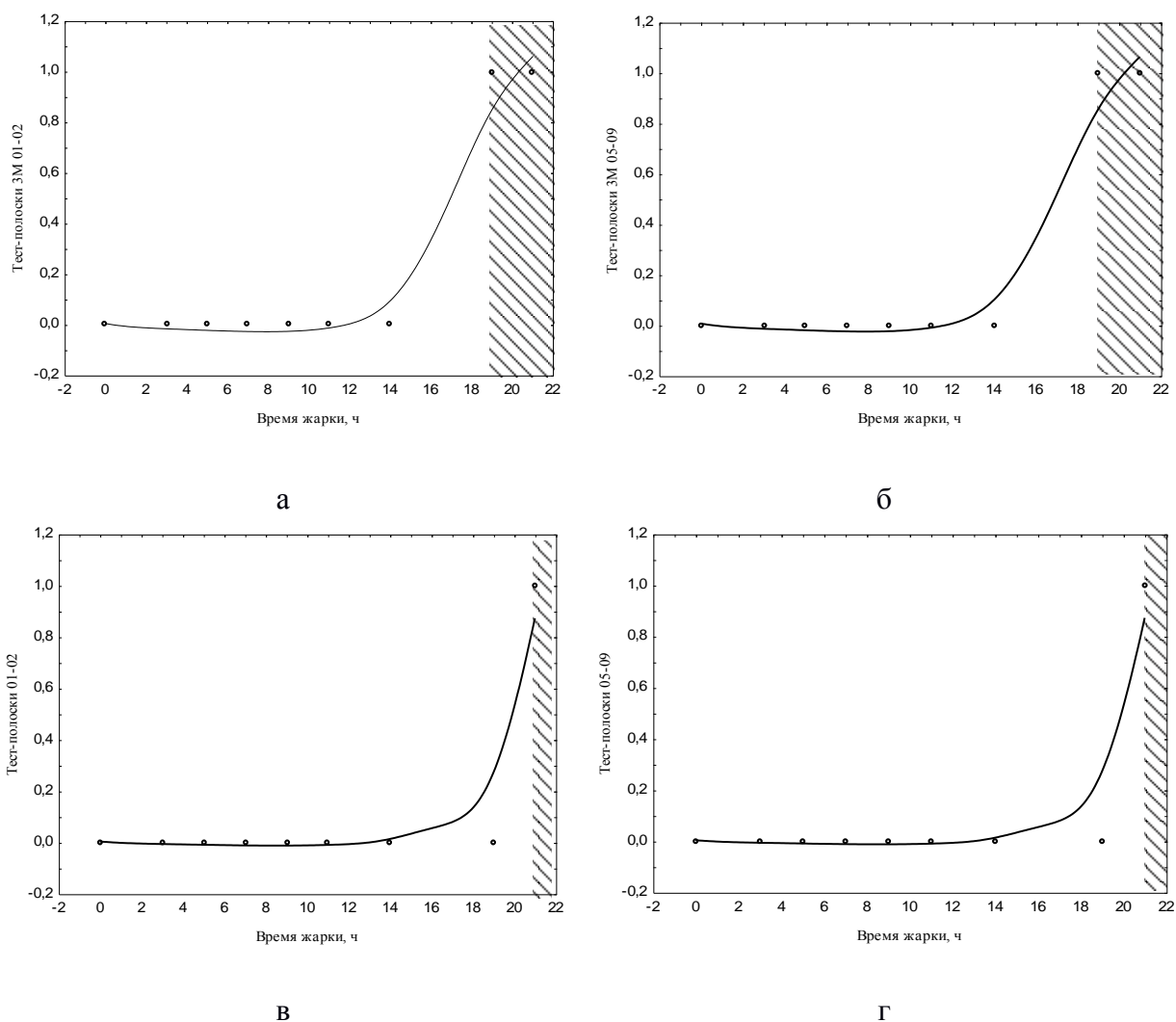
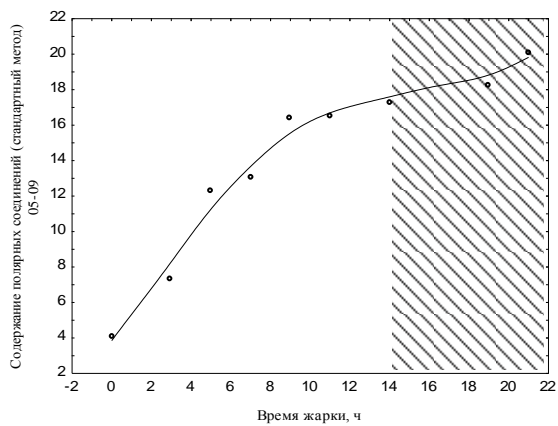
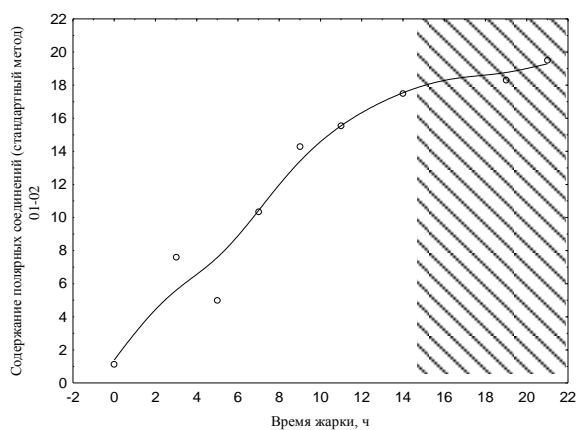


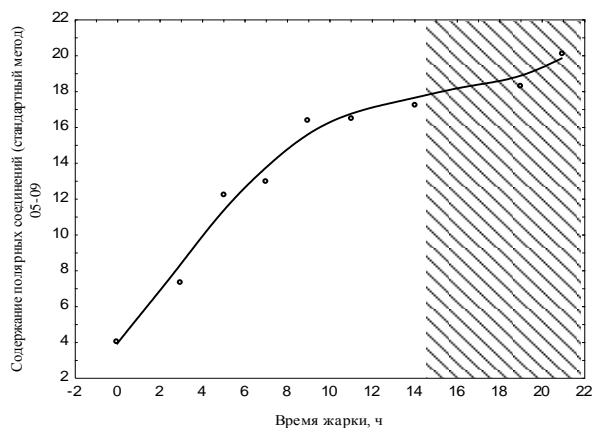
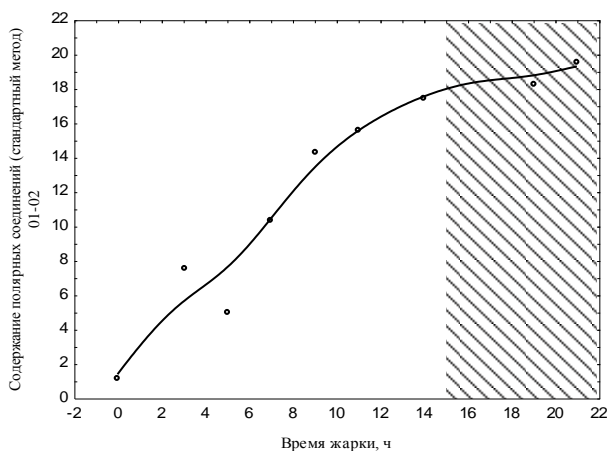
Рисунок 18 – Динамика показаний тест-полосок ЗМ во время жарки картофеля (при содержании влаги 7%: а – масло 01-02, б – масло 05-09; при содержании влаги 11%: в – масло 01-02, г – масло 05-09)

На рис. 19 и 20 приведены результаты исследования содержания ОПВ стандартным методом с использованием колоночной хроматографии и с измерением диэлектрической постоянной при помощи прибора FOM 320.



а

б



в

г

Рисунок 19 – Динамика изменения содержания полярных веществ (стандартный метод) во время жарки картофеля (при содержании влаги 7%: а – масло 01-02, б – масло 05-09; при содержании влаги 11%: в – масло 01-02, г – масло 05-09)

Для стандартного метода определения ОПВ масло считалось непригодным для дальнейшего использования спустя 14 ч после начала жарки в случае содержания влаги в системе 7% и 15 ч – при содержании влаги 11%.

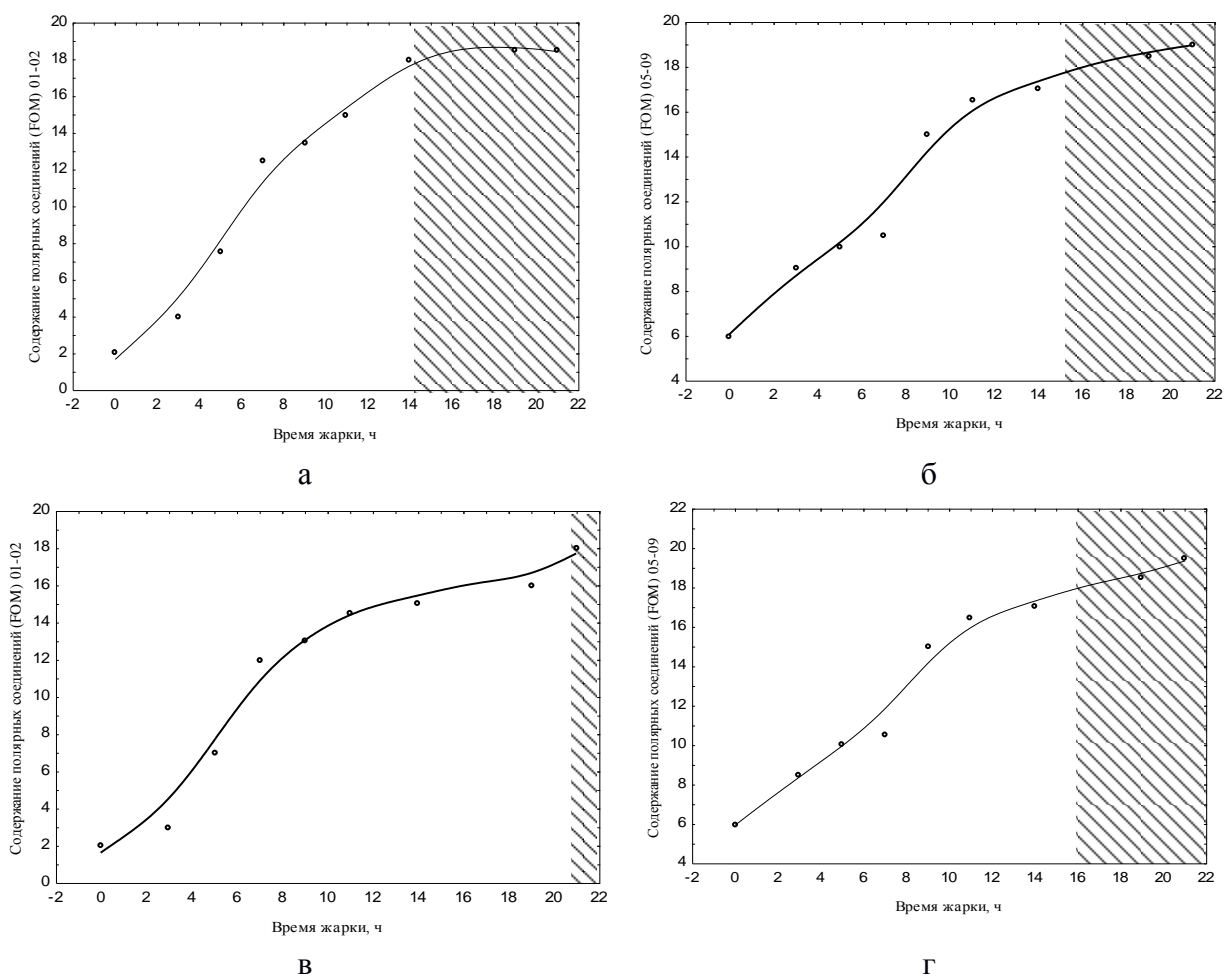


Рисунок 20 – Динамика изменения содержания полярных веществ (по прибору FOM) во время жарки картофеля (при содержании влаги 7%: а – масло 01-02, б – масло 05-09; при содержании влаги 11%: в – масло 01-02, г – масло 05-09)

При измерении содержания ОПВ при помощи прибора FOM 320 были получены отличающиеся результаты: в эксперименте с содержанием влаги 7% масла 01-02 и 05-09 необходимо было заменить спустя 14 и 15 ч жарки соответственно, а в эксперименте с содержанием влаги 11% – через 21 и 18 часов соответственно.

Динамика изменения различных показателей качества и безопасности фритюрных жиров в процессе жарки в лабораторных условиях была сопоставлена посредством статистического анализа данных (табл. 20)

Таблица 20 – Коэффициенты корреляции между показателями окислительной и гидролитической порчи масла в условиях лабораторной жарки

N=36 p<0,05	Анизидиновое число	Кислотное число	Коэффициент экстинкции	Показатель преломления	ОПВ
Анизидиновое число	—				
Кислотное число	0,9668	—			
Коэффициент экстинкции	0,8910	0,8466	—		
Показатель преломления	0,5576	0,3915	0,5381	—	
ОПВ	0,9677	0,945	0,8626	0,6151	—

В выборку для проведения корреляционного анализа были включены только методы, имеющие непрерывный (не дискретный) характер изменения.

Из данных таблицы 20 следует, что наибольшее сходство в динамике изменения показателей наблюдается между показателями анизидинового числа и содержанием ОПВ, кислотным числом и коэффициентом экстинкции при 232 нм, а также между динамикой изменения содержания ОПВ и динамикой изменения кислотного числа.

Стоит отметить, что в данном случае наличие высоких коэффициентов корреляции между результатами изменения различных показателей характеризуют лишь схожесть накопления аналитов и не обуславливает взаимосвязь механизмов накопления различных продуктов порчи фритюрных жиров.

Подробнее о динамике изменения показателя преломления фритюрного жира, имеющей слабую связь с динамикой изменения остальных показателей, описано далее по тексту диссертации.

Данные о времени, необходимом для замены фритюрного жира, обобщены в табл. 21.

Таблица 21 – Обобщенные данные по проведенным экспериментам

Измеряемый показатель	Время до необходимости замены масла, ч			
	Содержание влаги 7 %		Содержание влаги 11%	
	01-02	05-09	01-02	05-09
Сенсорный анализ	11	9	11	9
Анизидиновое число	1	1	1	1
Показатель преломления	18	18	19	19
Кислотное число	15	17	18	20
Коэффициент экстинкции	5	5	9	8
Метиленовый синий	11	9	11	9
Тест-полоски	19	19	21	21
ОПВ _{ст}	14	14	15	15
ОПВ _{ФОМ}	14	15	21	18

В соответствии с данными таблицы 21, период времени до замены фритюрного жира очень сильно варьирует в зависимости от метода контроля. Так в случае применения в качестве контрольного показателя анизидинового числа, время, необходимое для замены фритюрного жира составляет всего 1 час, при этом, если основываться только на результатах исследований при помощи тест-полосок (именно данный метод применяется на большинстве предприятий общественного питания), то жарку можно проводить вплоть до 21 часа.

Отличия в допустимой продолжительности жарки объясняются, в первую очередь, различиями в чувствительности методов, а также различиями в их селективности.

Например, показатель кислотного числа характеризует кислотность образца масла, связанную с развитием процессов гидролиза триглицеридов масла (рис. 21).

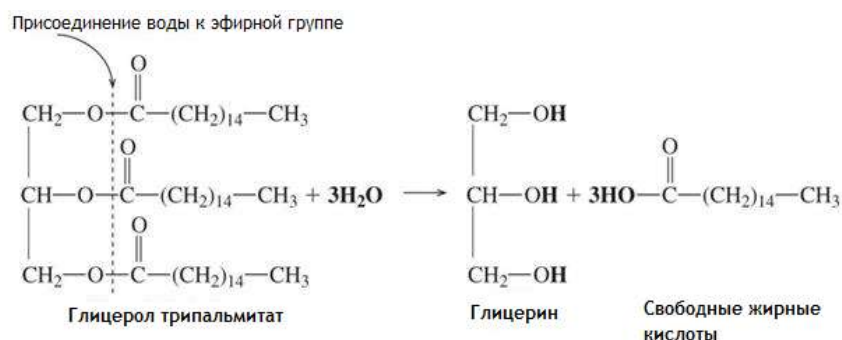


Рисунок 21 – Уравнение полного гидролиза триглицеридов до глицерина и свободных жирных кислот

Как показано на рисунке 21, в результате гидролиза триглицеридов образуются глицерин и свободные жирные кислоты, которые и определяют значение кислотного числа в масле. Стоит отметить, что сами свободные жирные кислоты, в адекватных количествах, не являются токсичными и образуются в результате схожих гидролитических реакций в процессе пищеварения, однако, увеличение содержания свободных жирных кислот, в силу стерических факторов, приводит к значительному ускорению развития окислительных процессов.

При этом, как было показано в обзоре литературы (п. 2.2.4), в процессе высокотемпературной обработки масел и жиров во время обжаривания пищевых продуктов образуется широкий ряд токсических веществ, не влияющих на кислотность масла, в результате чего даже при допустимых значениях кислотного числа их содержание может быть выше допустимых нормативов.

Таким образом, показатель кислотного числа характеризует не столько токсичность фритюрных жиров, сколько риски развития окислительных процессов. В связи с этим контроль качества и безопасности фритюрных жиров по показателю кислотного числа (равно как и по окраске тест-полосок) оказывается наименее чувствительным по сравнению с другими показателями.

В противоположность данному примеру можно привести изменение показателей анизидинового числа, коэффициента экстинкции при 232 нм, а

также реакции с метиленовым синим. Общим для указанных методов является значительная зависимость результатов измерений от типа образовавшихся продуктов окисления.

Допустимое значение анизидинового числа, равное 3 для рафинированного дезодорированного подсолнечного масла, подразумевает, что единственным (или преобладающим) компонентом, вступающим в реакцию с п-анизидином, является малоновый альдегид, при реакции с которым образуется хромофор, обладающий максимумом поглощения при длине волны 350 нм: (рис. 22).

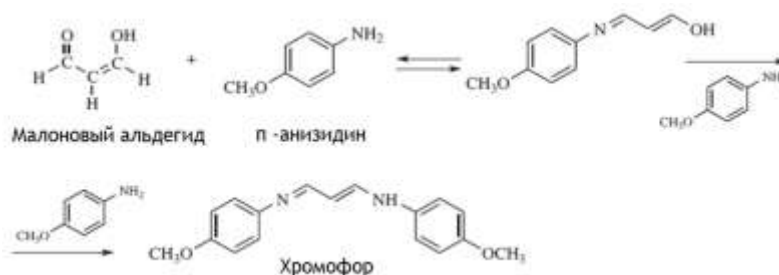


Рисунок 22 – Предполагаемый механизм реакции между п-анизидином и малоновым альдегидом

В случае измерения значения анизидинового числа во фритюрных жирах, кроме малнового альдегида в реакцию с п-анизидином вступают, в том числе продукты, термического распада белков и углеводов, что значительно повышает измеряемые значения анизидинового числа и подтверждается линейным ростом значения этого показателя.

Данным фактом объясняется столь резкое повышение значения анизидинового числа уже спустя час после начала жарки, то есть после 2 циклов жарки пищевого продукта.

Коэффициент экстинкции при 232 нм, отражающий содержание конъюгированных диенов, подобно значению анизидинового числа, в существенной степени зависит от химической природы продуктов окисления. Данное явление связано с тем, что образование конъюгированных соединений имеет место только при окислении полиненасыщенных жирных кислот, имеющих две и более двойные связи (рис. 23).

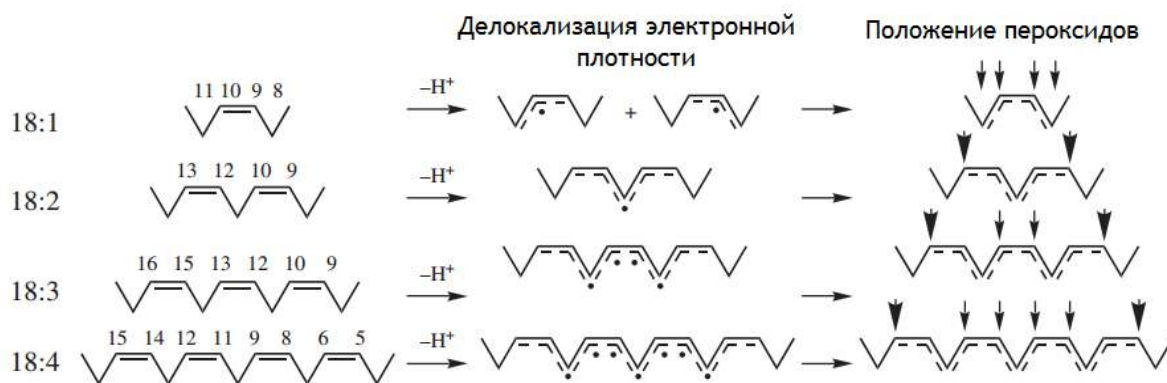


Рисунок 23 – Механизм образования конъюгированных соединений и продуктов их перекисного окисления

Как показано на рисунке 23, количество образованных конъюгированных соединений напрямую зависит от количества двойных связей в жирной кислоте. При более высокой степени ненасыщенности процесс образования конъюгированных соединений будет иметь более выраженный характер.

Основным риском при образовании конъюгированных соединений в процессе жарки пищевых продуктов является последующее образование наиболее токсичных соединений – циклических жирных кислот (рис. 24).

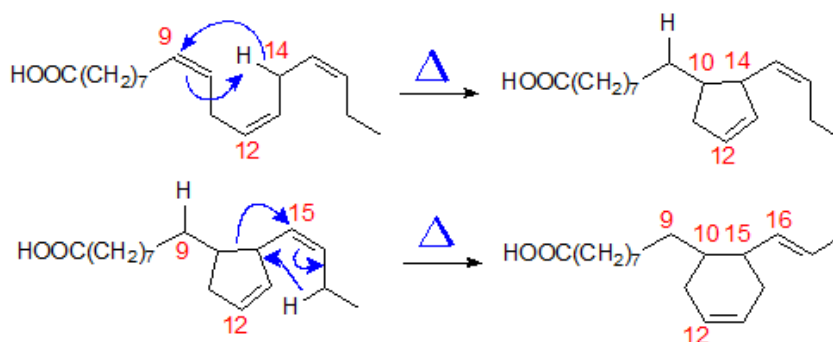


Рисунок 24 – Предполагаемый механизм образования циклических соединений из конъюгированных жирных кислот

Важным в данном процессе является то, что продукты циклизации уже не содержат конъюгированных связей, в результате чего они не могут быть обнаружены при изучении коэффициента экстинкции при 232 нм.

Образование циклических жирных кислот и других продуктов конденсации конъюгированных диенов обуславливает скачкообразное изменение значения коэффициента экстинкции и является фактором, ограничивающим общее количество конъюгированных соединений во фритюрных жирах.

Реакция с метиленовым синим, в свою очередь, характеризует наличие химических соединений, способных к реакции окисления метиленового синего с изменением окраски его раствора. К данным соединениям могут относиться как продукты окисления липидов, так и продукты окисления белков, что является причиной ложноположительных результатов при высоком содержании белка в обжариваемом продукте.

Содержание ОПВ, а также значение показателя преломления фритюрного жира являются кумулятивными интегральными показателями.

Интегральность показателя содержания ОПВ, измеряемого как методом жидкостной колоночной хроматографии, так и кондуктометрическим методом, обусловлена тем, что подавляющее большинство первичных и вторичных продуктов гидролитической, окислительной и термической порчи являются полярными. При этом чувствительность данных методов позволяет исключить влияние продуктов окисления белков и углеводов из обжариваемого продукта при минимальной механической очистке масла.

Основным недостатком метода определения ОПВ при помощи жидкостной колоночной хроматографии является его трудоемкость и наличие квалифицированного персонала, способного качественно выполнять измерения. Главным недостатком кондуктометрического метода определения содержания ОПВ является необходимость проведения измерений непосредственно в емкости, в которой проводится жарка пищевого продукта, что не позволяет использовать данный метод при оценке содержания ОПВ при проточной жарке пищевых продуктов.

В отличие от методов определения ОПВ, значение показателя преломления фритюрного жира значительно зависит от химической природы продуктов окисления, и, как показано на рис. 14, имеет сигмоидальную динамику роста с выходом на плато.

Резкий рост значения показателя преломления обусловлен тем, что конъюгированные соединения, образующиеся при термической обработке масел, неаддитивно увеличивают показатель преломления масла. Выход на плато свидетельствует о том, что все ПНЖК перешли в конъюгированное состояние с сопутствующим образованием перекисных радикалов в алоложении.

Примечательным в данном случае является резкое усиление горького привкуса при сенсорной оценке в области выхода на плато, что, по всей видимости, связано с накоплением низкомолекулярных карбонильных соединений.

Показатель преломления масел (немагнитного диэлектрика) связан с его диэлектрической проницаемостью формулой

$$n^2 = \varepsilon,$$

где, n – показатель преломления, ε – диэлектрическая проницаемость.

В связи с этим измерение показателя преломления фритюрного жира было изучено в качестве потенциального метода оценки его качества в процессе непрерывной жарки, при которой применение стандартных методов измерения в силу технологических особенностей не представляется возможным.

Процесс непрерывной жарки проводили в условиях производства снековой продукции на следующем этапе исследования.

Изучение изменения показателя преломления фритюрного жира, используемого в условиях производства снековой продукции, проводилось с целью установления применимости данного метода в условиях в виде ключевого критерия качества и безопасности.

В отличие от предыдущего этапа исследований, на данном этапе жарка проводилась в течение более продолжительного периода (41 час). Результаты исследований изменения показателя преломления приведены на рис. 25.

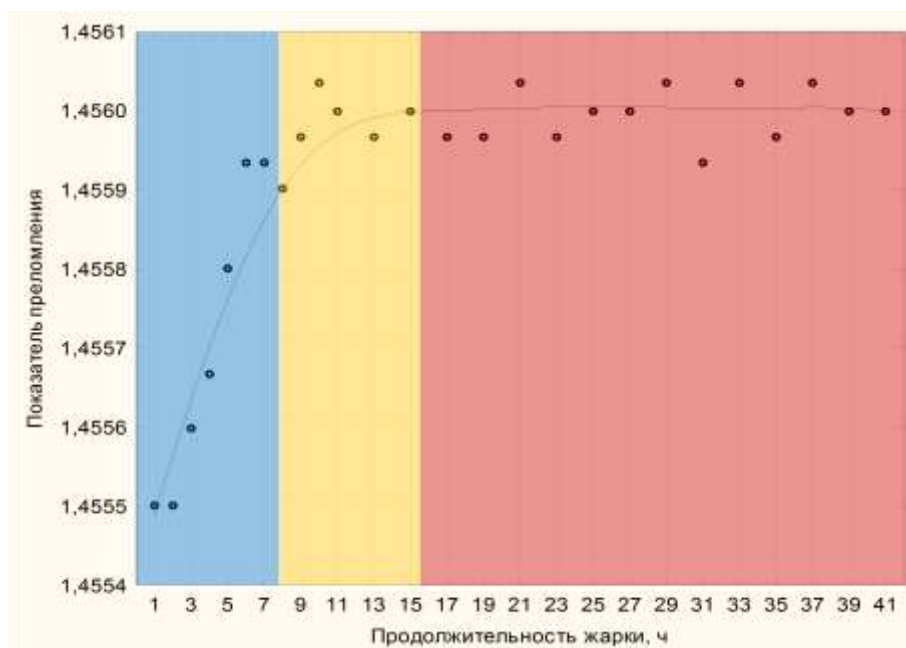


Рисунок 25 – Изменение показателя преломления фритюрного жира в условиях производства снековой продукции

Данные, представленные на рис. 25, свидетельствуют о том, что в производственных условиях при продолжительном времени жарки динамика изменения показателя преломления фритюрного жира соответствует динамике изменения данного показателя в лабораторных условиях.

Характерным для данного показателя также является сигмовидный рост, при котором выделяются три стадии:

1. Стадия активного роста показателя преломления (выделено синим цветом).
2. Стадия замедления роста (обозначено желтым цветом).
3. Стадия выхода показателя преломления на предельное значение (обозначено красным цветом).

Резкое изменение сенсорных характеристик фритюрного жира, связанное с активным накоплением вторичных продуктов окисления, имеет

место при переходе из первой стадии во вторую и продолжается после перехода в третью стадию.

Таким образом, установлено, что измерение показателя преломления может служить ключевым критерием при оценке изменений качественных характеристик во фритюрном жире в условиях производства снековой продукции.

4.5 Разработка метода выполнения измерений общих полярных веществ во фритюрных жирах

Данные, приведенные в обзоре литературы, а также результаты исследований по пункту 4.4 диссертационной работы свидетельствуют о высокой значимости содержания общих полярных веществ при оценке безопасности фритюрных жиров.

Определение содержания ОПВ методом жидкостной колоночной хроматографии в настоящее время может быть использовано на основании соответствующего стандарта (ГОСТ Р ИСО 8420-2013 Животные и растительные жиры и масла. Определение содержания полярных соединений).

Как указывалось ранее, данный метод является достаточно трудоемким и требует использования токсичных и легко воспламеняющихся реактивов для проведения исследований, что ограничивает возможность его использования в условиях предприятий общественного питания, подавляющее большинство из которых не оснащено специализированными аналитическими лабораториями.

Данное обстоятельство обуславливает невозможность проведения достоверного контроля и регулирования гигиенических рисков в процессе жарки пищевых продуктов.

В связи с этим, на данном этапе диссертационного исследования была проведена разработка метода выполнения измерений содержания общих полярных веществ в растительных и животных маслах и жирах

кондуктометрическим методом, не требующим использования органических растворителей, специально обученных специалистов и лабораторных помещений для проведения исследований.

Основными этапами при разработке метода выполнения измерений содержания ОПВ в маслах и жирах кондуктометрическим методом являлись установление условий проведения измерений, факторов, мешающих измерению, и диапазонов линейности значений.

Анализ результатов исследования лабораторных образцов фритюрных масел и жиров показал, что температура исследуемого фритюрного жира должна находиться в диапазоне 140-180 °С, при этом измерению мешают посторонние включения в масле: вода или остатки обжариваемого продукта.

В выборку для установления диапазона линейности зависимости значений, полученных кондуктометрическим методом и стандартным хроматографическим методом, вошли значения по 36 пробам, полученные в пункте 4.4 диссертационной работы.

Для выявления диапазона линейности был проведен регрессионный анализ имеющихся данных. Результаты исследований представлены на рис. 26.

Данные, представленные на этом рисунке, свидетельствуют о распределении значений ОПВ, близком к нормальному, при этом наблюдается тесная корреляция между результатами измерений ($r = 0.9553$, $r^2 = 0.9126$, $p = 0.00001$).

Таким образом, показано, что диапазон значений содержания общих полярных веществ от 0 до 20 характеризуется линейной зависимостью между результатами исследований по обоим методам.

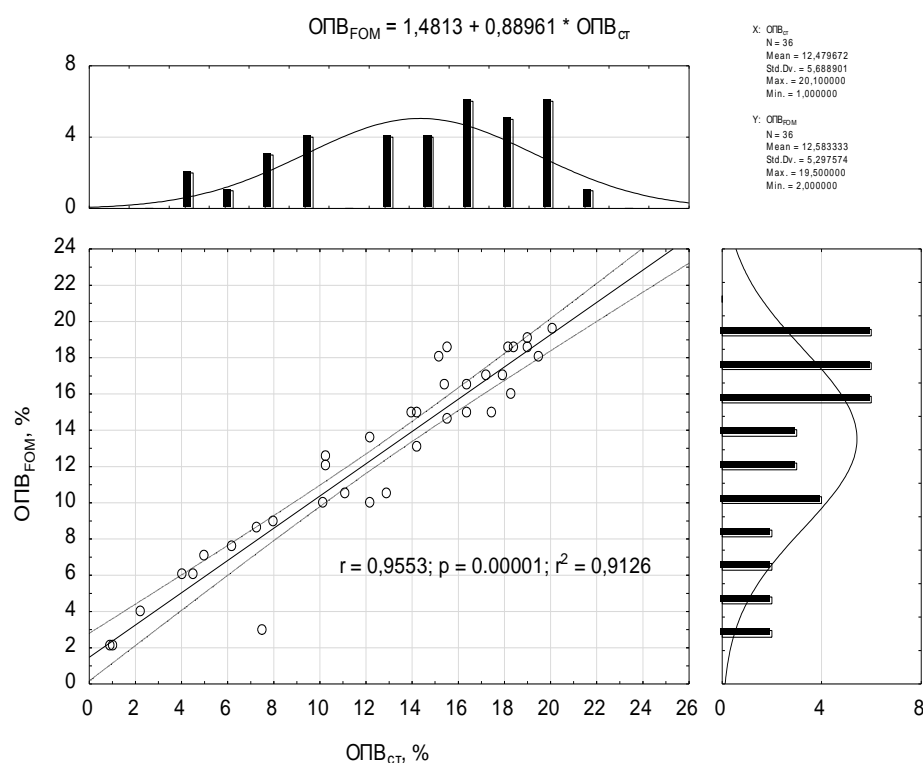


Рисунок 26 – Диаграммы распределения значений ОПВ и взаимосвязи между содержанием ОПВ при измерении стандартным методом ($ОПВ_{СТ}$) и при помощи прибора FOM 320 ($ОПВ_{FOM}$); N – количество образцов, $Mean$ – среднее значение, $STD.DV$ – стандартное отклонение, Max – максимальное значение, Min – минимальное значение

На основании экспериментальных данных, были установлены метрологические характеристики кондуктометрического метода определения содержания общих полярных веществ. Установленные значения приведены в табл. 22.

Таблица 22 – Метрологические характеристики метода определения содержания полярных веществ измерением диэлектрической проницаемости

Метрологическая характеристика ($P = 95\%$)	Диапазон измерений, полярных веществ	
	до 10 включ.	св. 10 до 20 включ.
Предел повторяемости r , % полярных веществ	1,4	2,8
Предел воспроизводимости R , % полярных веществ	2,8	5,6
Показатель точности (границы абсолютной погрешности) $\pm\Delta$, % полярных веществ	2,0	4,0

Установлены различия в значениях предела повторяемости, предела воспроизводимости и показателя точности для диапазонов содержания ОПВ от 0 до 10 % ОПВ и от 10 до 20 % ОПВ.

На основе проведенных исследований по пунктам 4.4 и 4.5 совместно с ОАО «ВНИИС» был разработан стандарт (ГОСТ Р 54607.3-2014 Услуги общественного питания. Методы лабораторного контроля продукции общественного питания. Часть 3. Методы контроля соблюдения процессов изготовления продукции общественного питания), регламентирующий набор методов и гигиенических показателей, позволяющих осуществлять надлежащий контроль процессов жарки пищевых продуктов. Помимо стандарта указанные результаты исследований были оформлены в виде рекомендаций по контролю качества фритюрных жиров и зарегистрированы в качестве результатов НИОКР по темам *«Изучение взаимосвязи между диэлектрической постоянной фритюрного жира и показателями его окислительной и гидролитической порчи»* и *«Исследование окислительных процессов, протекающих во фритюрном жире и картофельных чипсах в условиях производства. Разработка практических рекомендаций для повышения окислительной устойчивости готовой продукции»*.

4.6 Скрининговые исследования активности ингибиторов липоксигеназы-1 сои

Контроль процессов ферментативного окисления липидов играет большую роль при контроле образования продуктов перекисного окисления в нерафинированных маслах в силу высокой специфичности и скорости протекания реакции, на порядок превышающей скорость протекания неферментативного перекисного окисления.

Как было отмечено в обзоре литературы, основной группой ферментов растений, участвующих в развитии процессов перекисного окисления, являются липоксигеназы (LOX) – железосодержащие ферменты, относящиеся к классу диоксигеназ. Субстратом для большинства LOX являются свободные полиненасыщенные жирные кислоты, находящиеся в водной среде, однако некоторые LOX, такие как липоксиеназа-1 и липоксигеназа-2 сои способны окислять мембранные липиды. Принимая во

внимание, что объектом исследований в рамках диссертационной работы являются нерафинированные масла, именно данные представители липоксигеназ представляют наибольший интерес.

Наиболее изученной среди описанных выше липоксигеназ является LOX-1 сои, для которой имеются сведения о кинетических параметрах связывания с ингибиторами.

Учитывая тот факт, что в качестве ингибиторов липоксигеназ как растений, так и млекопитающих чаще всего используют вещества полифенольной природы, для скрининговых исследований были выбраны соединения, относящиеся к различным классам полифенолов, среди которых: антоцианидины, антоксантины, ауроны, халконы, дигидрофлавоны, флавононы, флаваны и изофлавоны.

В настоящее время имеется достаточное количество сведений об отдельных химических веществах, способных ингибировать липоксигеназную активность, в связи с чем, целью исследований на данном этапе работы было выявление общих параметров, характеризующих ингибирующую способность веществ полифенольной природы по отношению к LOX, и разработка прогностической системы, способной достоверно оценивать ингибирующую способность новых видов синтетических полифенолов, а также многочисленных представителей данной группы, не вошедших в выборку при скрининговых исследованиях.

В качестве основного подхода, позволяющего проводить описанные выше скрининговые исследования за время, отведенное на выполнение данной диссертационной работы, был использован метод молекулярного докинга исследуемого фермента с лигандами, потенциальными ингибиторами ферментативной активности (см. раздел 3.8).

Из указанных выше липоксигеназ, способных окислять мембранные липиды, в базах данных белков имеются лишь сведения о структуре LOX-1 сои, полученные в результате рентгеноструктурного анализа с разрешением, равным 1,4 Å.

Структура LOX-1 сои представлена на рисунке 27.

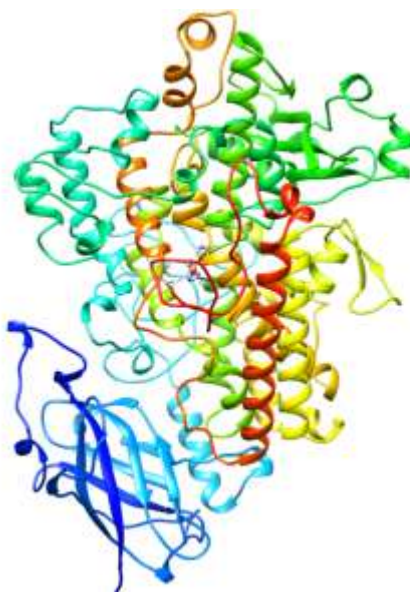


Рисунок 27 – Структура липоксигеназы-1 сои [DOI:10.2210/pdb1yge/pdb]

Как видно из рис. 27, LOX-1 сои состоит из одной полипептидной цепи, включающей две доменные структуры: малый N-складчатый- β -терминальный домен (помечен синим и голубым цветами) и большой α -спиральный каталитический домен (красный, желтый, оранжевый и зеленый цвет), в котором располагается каталитический центр фермента.

Каталитическая активность LOX-1 сои в большей степени обусловлена активностью иона железа в окисленной форме (Fe^{3+}), расположенного в активном центре фермента (рис. 28).

Как показано на рис. 28, ион железа окружен пятью аминокислотными остатками, образующими вокруг него октаэдрическую структуру, при этом связь с ионом осуществляется только для 4 аминокислотных остатков, пятый аминокислотный остаток (Асп⁶⁹⁴) участвует в комплексообразовании с лигандом. Также важную роль для поддержания каталитической активности LOX-1 сои играет молекула воды (H_2O^{842}), связанная посредством водородных связей с аминокислотными остатками Иле⁸³⁹, Асп⁶⁹⁴ и координационной связи – с ионом железа.

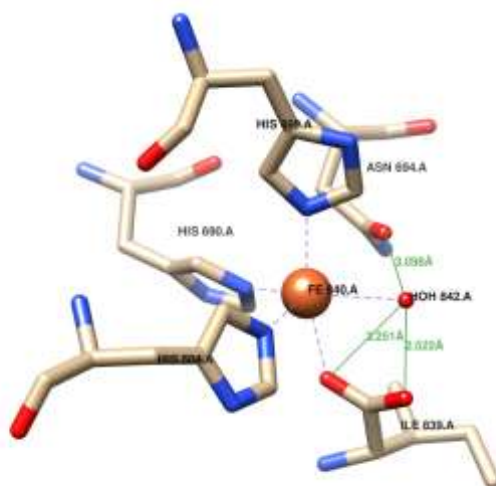


Рисунок 28 – Расположение иона Fe^{3+} в активном центре LOX-1 сои

Структура самого активного центра LOX-1 является не до конца изученной в связи с отсутствием данных рентгеноструктурного анализа, описывающих положение субстрата в активном центре LOX-1 сои. Тем не менее, в настоящее время рядом авторов выдвинуто несколько гипотез, описывающих аминокислоты, участвующие в комплексообразовании.

Суммируя данные, опубликованные в научной литературе, в качестве аминокислотных остатков, необходимых для связывания лиганда в активном комплексе, были выбраны следующие: Сер⁷⁴⁷, Тре⁵⁵⁶, Фен⁵⁵⁷, Гис⁵⁰⁴ и Иле⁸³⁹, включая аминокислотные остатки, расположенные на расстоянии не более 6 Å от них.

С целью валидации разработанной модели активного центра LOX-1 сои была составлена выборка, включающая вещества с известной константой ингибирования k_i (табл. 23).

В этой же таблице представлен расчет свободной энергии связывания (ΔG) комплексов.

Таблица 23 – Экспериментальные и расчетные параметры взаимодействия фермента и лиганда[229–235]

№	Лиганд	k_i (экспериментально), нМ	$\ln(k_i)$	ΔG (расчетная), кДж/моль
1	Тиранундека-9-еновая кислота	2000	7,6009	-45
2	Мирициловый спирт	3200	8,0709	-45
3	Тиранундекановая кислота	4000	8,2940	-38
4	2-[2-(4-Гептилфенил)этил]-4,6-ДГБК	9800	9,1901	-33
5	Хризин	19400	9,8730	-30
6	Бутиловый эфир 3,4-ДГБК	19700	9,8884	-37
7	цис-Олеиновая кислота	22000	9,9988	-32
8	Тетрагидрокуркумин	46000	10,7364	-34
9	Кверцетин	106700	11,5778	-17
10	Лютеолин	121700	11,7093	-30
11	цис-Пальмитоилсульфат	140000	11,8494	-27
12	Пиразон	160000	11,9829	-20

Принимая во внимание, что значения ΔG и k_i связаны между собой по формуле:

$$\Delta G = -RT * \ln k_i,$$

С целью выявления линейной зависимости между расчетными и экспериментальными значениями. Дополнительно были рассчитаны значения $\ln k_i$, также внесенные в табл. 23. Результаты исследований, устанавливающих корреляцию между расчетными и экспериментальными значениями, приведены на рис. 29.

Результаты статистического анализа данных установили наличие тесной корреляции ($r = 0,89$, $r^2 = 0.7970$, $p < 0.0001$) между значениями экспериментальных и расчетных данных, что обуславливает возможность применения выбранной модели активного центра LOX-1 при анализе ингибиторов.

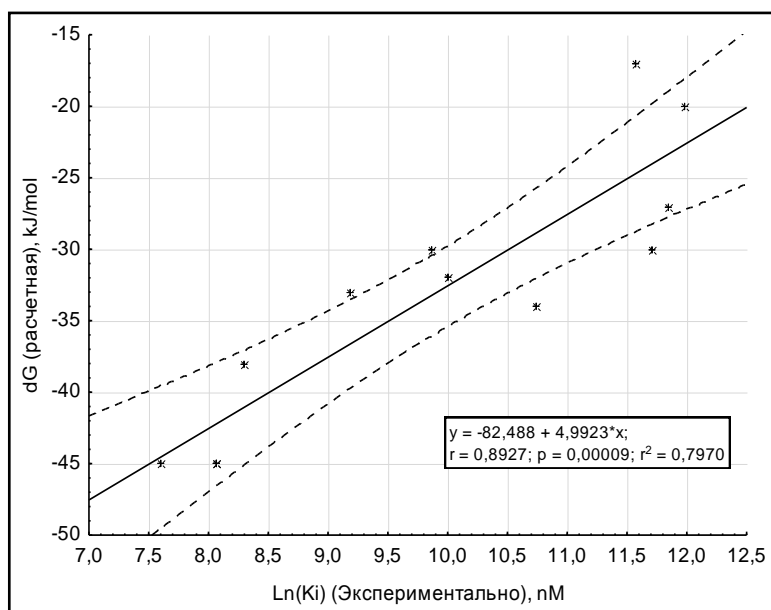


Рисунок 29 – Корреляция расчетных значений свободной энергии связывания и экспериментальных значений натурального логарифма константы ингибирования для тестовой выборки лигандов

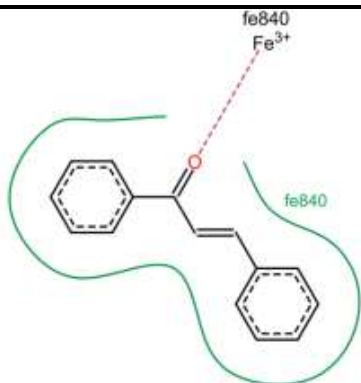
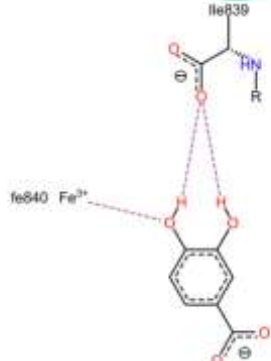
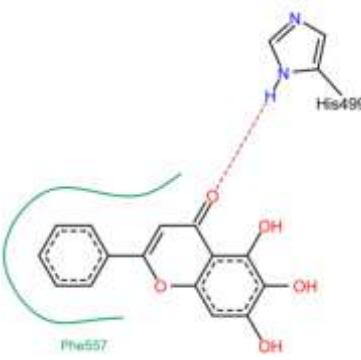
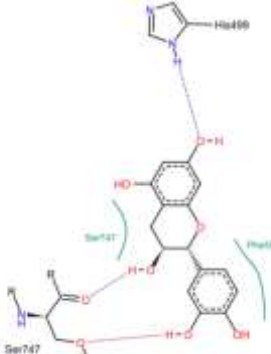
С применением данной модели активного центра было проанализировано в общей сложности 106 индивидуальных соединений полифенольной природы. Общие результаты исследований приведены в приложении В.

По результатам выполненной оценки, лиганды были ранжированы в соответствии со значениями $\Delta G_{св}$, а также коэффициента эффективности лиганда (ЭЛ), рассчитанного с учетом вклада каждого атома в образование фермент-лигандного комплекса.

Результаты исследования некоторых активных лигандов приведены в табл. 24.

Анализ данных, приведенных в таблице, свидетельствует о наличии различных механизмов ингибирования фермента в зависимости от способа связывания лиганда с ферментом.

Таблица 24 – Типовые взаимодействия в фермент-лигандных комплексах

Лиганд	ΔG , кДж/моль	ЭЛ, ккал/моль	Предполагаемый механизм связывания
Халкон	-33	0,49	
Протокатеховая кислота	-31	0,68	
Байкалеин	-21	0,5	
(+)-Катехин	-19	0,22	

Наибольшую ингибирующую активность по отношению к LOX-1 сои в условиях эксперимента проявили халкон, 2-гидросихалкон, лютеолин, хризин и байкалеин, связывающиеся непосредственно с ионом железа в

активном центре и участвующие в гидрофобных взаимодействиях с активным центром.

Также значительная активность в условиях эксперимента была показана для протокатеховой кислоты, не относящейся к соединениям полифенольной природы, но образующейся при разрушении кверцетина в активном центре липоксигеназы. Ингибирующее действие протокатеховой кислоты обусловлено, очевидно, исключительно хелатирующими свойствами соседних фенольных групп.

Другие соединения полифенольной природы в своем большинстве имеют смешанный механизм связывания, объединяющий гидрофильные взаимодействия, хелатирование иона железа, а также связывание с основными аминокислотными остатками активного центра фермента.

Сведения об активности ингибиторов полифенольной природы были использованы в пункте 4.7 диссертации при разработке прогностической системы оценки ингибирующей способности полифенолов.

4.7 Выявление взаимосвязи между структурой и способностью флавоноидов к ингибированию липоксигеназной активности

На первом этапе разработки прогностической системы, все лиганды были обобщены в таблице в виде их молекулярных дескрипторов, характеризующих заместители по номеру атома углерода в молекуле полифенола (рис. 30), а также по наличию двойной связи между 2 и 3 атомами углерода и общим количеством гидроксильных, углеводородных и углеводных заместителей.

При помощи метода регрессионных деревьев принятия решений была установлена значимость отдельных молекулярных дескрипторов на значение $\Delta G_{св}$ (рис. 30). Результаты анализа свидетельствуют о том, что наибольший вклад в формирование значения свободной энергии связывания имеет общее количество углеводных и углеводородных заместителей, а также тип

заместителя при 4'-углеродном атоме. Меньший вклад имеет тип заместителя при 6, 7 и 8 атомах углерода, а также общее количество ОН-групп.

Класс соединений, а также тип заместителей при остальных углеродных атомах оказывает не столь значимое влияние на формирование значения $\Delta G_{св}$.

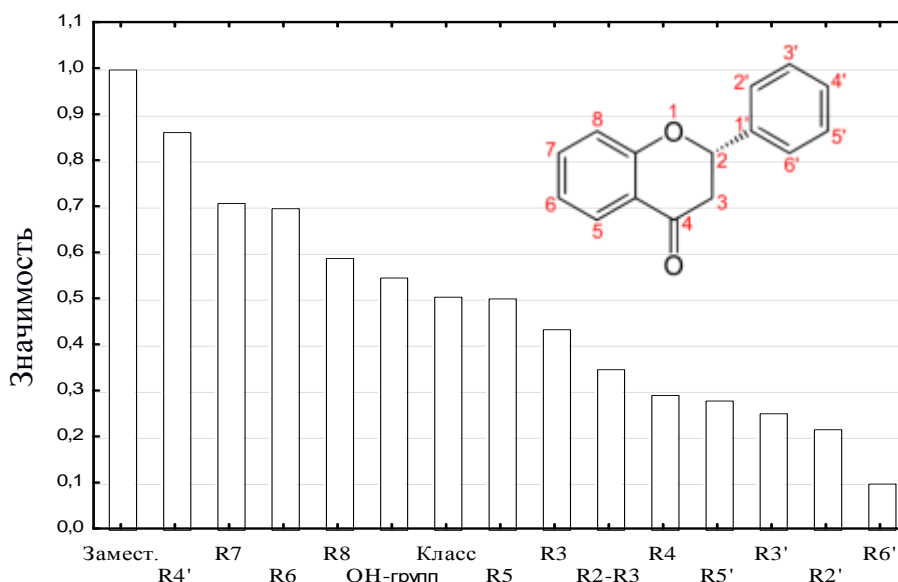


Рисунок 30 – Принятая нумерация углеродных атомов в молекуле полифенола и значимость молекулярных дескрипторов при оценке ингибирующей способности (Замест. – общее количество углеводных и углеводородных заместителей, ОН-групп – общее количество гидроксильных групп, R2-R3 – наличие двойной связи между вторым и третьим атомами углерода)

Используя таблицу молекулярных дескрипторов, разработанную на первом этапе, методами анализа с использованием искусственных нейронных сетей (ИНС) были разработаны прогностические системы, входным сигналом для которых являлись значения молекулярных дескрипторов, а выходным сигналом – значение свободной энергии связывания. Эффективность разработанных моделей обеспечивалась разбивкой общего массива информации на группы обучения, тестирования и валидации.

Таблица 25 – Статистические характеристики моделей ИНС.

Показатель	ИНС 1	ИНС 2	ИНС 3	ИНС 4	ИНС 5
Среднеквадратическая ошибка	18,02067	100,333	75,9681	23,17611	28,18658
Средняя абсолютная ошибка	3,61903	7,265565	5,447537	3,992938	3,944343
Средняя относительная квадратичная ошибка	0,445209	0,504357	0,487524	0,667006	0,434564
Средняя относительная абсолютная ошибка	0,544615	0,618136	0,596888	0,715273	0,515712
Коэффициент корреляции	0,917356	0,876502	0,858187	0,858645	0,919134

Выбор оптимальной архитектуры, алгоритмов обучения и функций активации нейронных сетей осуществляли при помощи критериев соответствия экспериментальных данных с спрогнозированными. Значения критериев соответствия для некоторых наиболее эффективных сетей приведены в таблице 21.

По результатам исследований установлено, что наиболее точные предсказания $\Delta G_{св}$ получены при помощи ИНС с 20 нейронами на скрытом слое, логистической функцией активации входного сигнала, тангенсальной функцией активации выходного сигнала и алгоритмом обучения Бройдена-Флетчера-Гольдфарба-Шанно (ИНС 1 в табл. 21).

Подробные сведения об архитектуре использованной нейронной сети приведены на рисунке 31. Как показано на данном рисунке нейронная сеть (NeuralNetwork), состоит из четырех основных частей, среди которых: слой, содержащий информацию об алгоритмах обучения (MiningSchema), слой входных данных для обработки (NeuralInputs), скрытый слой нейронов (NeuralLayer), на котором хранится информация об ошибках регрессионного анализа и слой спрогнозированных выходных данных (NeuralOutput).

Разработанная прогностическая модель позволит проводить поиск и разработку новых ингибиторов липоксигеназной активности для эффективного подавления окислительных процессов в нерафинированных маслах.

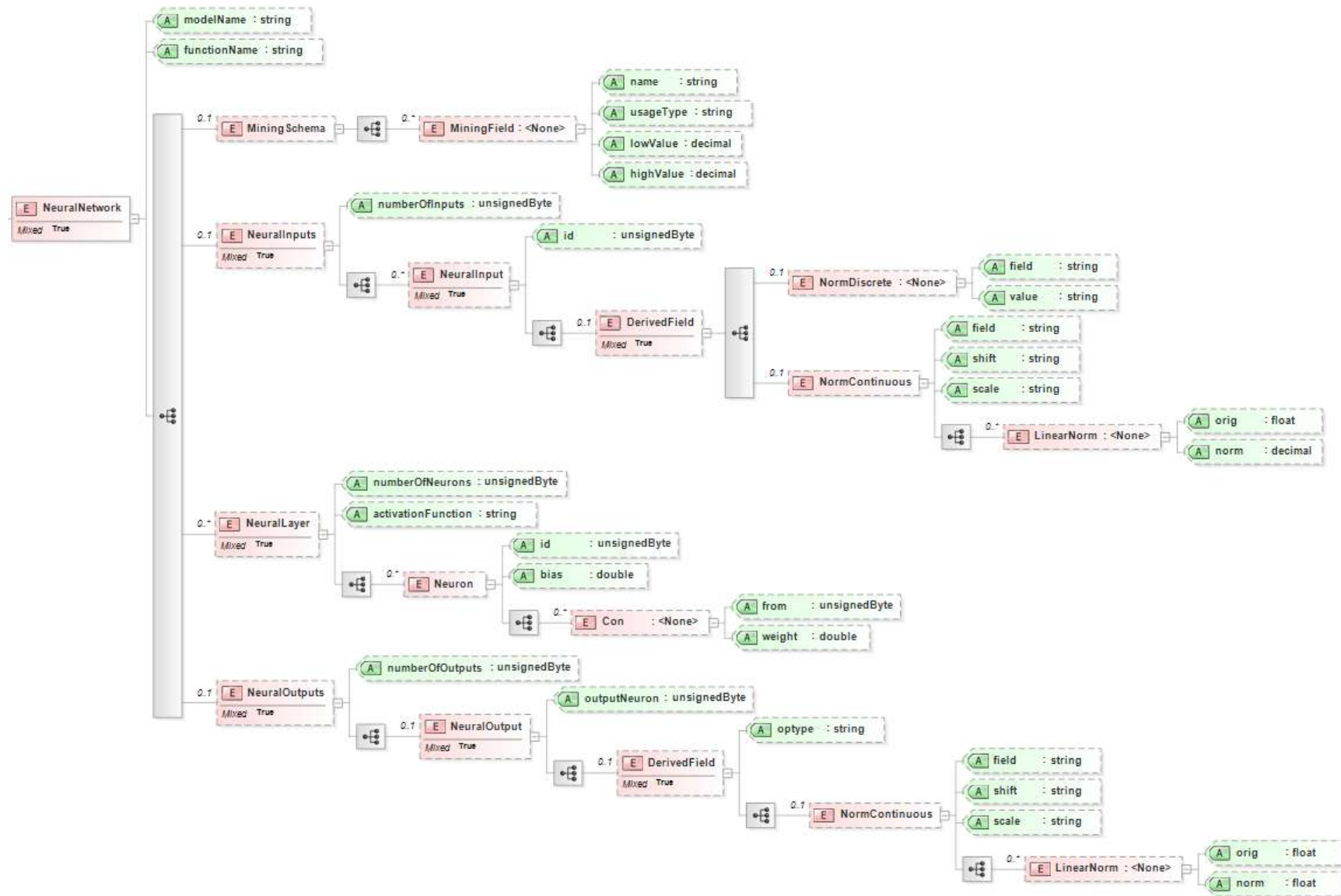


Рисунок 31 – Иерархическое дерево взаимосвязи структурных компонентов искусственной нейронной сети

5 ВЫВОДЫ

1. Обобщен химический состав масел и жиров растительных и животных, в результате чего выявлена достоверная статистическая взаимосвязь ($p < 0,05$) между жирнокислотным составом масел и жиров и компонентами их системы антиоксидантной защиты – токоферолов и фосфолипидов ($r_{mf}^2 = 0,8636$, $r_{fl}^2 = 0,9167$).
2. Полученные данные организованы в виде объектно-ориентированной базы данных, позволяющей осуществлять расчеты химического состава многокомпонентных жировых систем с целью установления необходимого содержания антиоксидантов для управления окислительными процессами в жировых продуктах.
3. Разработан принцип дифференциальной оценки степени развития процессов перекисного окисления липидов в случаях, при которых прямое определение перекисного числа затруднено или невозможно, основанный на параллельном измерении перекисного числа и потребления молекулярного кислорода в условиях *in situ*, без предварительной экстракции липидов из исследуемого объекта.
4. Разработан и внедрен в виде национального стандарта (ГОСТ Р 54607.3-2014) показатель содержания общих полярных веществ (ОПВ), метод определения и его нормативное значение, адекватно отражающее развитие процессов окислительной, гидролитической и термической порчи масел и жиров. Показатель ОПВ служит для оценки безопасности фритюрных масел и жиров.
5. Методами молекулярного моделирования с доказанной высокой предсказательной способностью ($r = 0,89$, $r^2 = 0,7970$, $p < 0,0001$) установлена и количественно охарактеризована взаимосвязь между структурой флавоноидов и их способностью к ингибированию процессов ферментативного окисления масел и жиров. На основании полученных данных установлено, что наибольшей активностью обладают халкон, 2-гидроксихалкон, лютеолин, а также хризин и байкалеин, проявляющие

активность в наномолярном соотношении к единице липоксигеназной активности.

6. Проведен анализ в общей сложности 526 проб пищевых масел, жиров и эмульсионных продуктов и 106 моделей флавоноидов на основании чего, были разработаны методы контроля и регулирования процессов ферментативного, термического и автоокисления липидов в пищевых масложировых продуктах.

6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Авен** – авенастерол
- АЛК** – альфа-линоленовая кислота
- ИНС** – искусственная нейронная сеть
- Камп** – кампстерол
- ОПВ** – общие полярные вещества
- Стер** – стерины
- Стиг** – стигмастерол
- ТТ** – токотриенол
- ТФ** – токоферол
- Фосф** – фосфолипиды
- Хол** – холестерол
- ТД** – температура дымообразования,
- КЧ** – кислотное число,
- СЖК** – свободные жирные кислоты,
- ОЖК** – окисленные жирные кислоты,
- ОПВ** – общие полярные вещества,
- ПС** – полярные соединения
- LOX** – липоксигеназа

7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ипатова Л.Г. et al. Жировые продукты для здорового питания. Современный взгляд. Москва, 2009. 396 р.
2. Нечаев А., Кочеткова А. Растительные масла функционального назначения // Масложировая промышленность. 2005.
3. Кочеткова А. Функциональные продукты в концепции здорового питания // Пищевая промышленность. 1999.
4. Кочеткова А., Колеснов А. Современная теория позитивного питания и функциональные продукты // Пищевая промышленность. 1999.
5. Лисицын А. Биологические особенности сортов рапса и физиологическая ценность жмыхов и шротов // Масложировая промышленность. 2007.
6. Лисицын А. Современные требования к масложировым продуктам // Масложировая индустрия материалы XI 2011.
7. Лисицын А. Стабильность масел с различным содержанием олеиновой кислоты при нагреве. // Масложировая промышленность. 2010.
8. Стеценко А. et al. О растительно-жировых спредах // Масложировая промышленность. 2006.
9. Лисицын А., Григорьева В. Окислительная деструкция растительных масел под воздействием высоких температур // Масложировая промышленность. 2007.
10. Лисицын А. Некоторые факторы, определяющие стабильность растительных масел к окислению/АН Лисицын, ТБ Алымова // Масложировая промышленность. 2005.
11. Лисицын А., Григорьев В. Масложировые технологии: теория, практика, перспективы // Масложировая промышленность. 2002.
12. Григорьева В., Лисицын А. Смеси растительных масел–биологически полноценные продукты // Масложировая промышленность. 2005.
13. Григорьева В., Лисицын А. Факторы, определяющие биологическую полноценность жировых продуктов // Масложировая промышленность. 2002.

14. Wanasundara P., Shahidi F. Antioxidants: science, technology, and applications // *Bailey's Ind. Oil Fat* 2005.
15. Shahidi F., Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. // *Chem. Soc. Rev.* 2010. Vol. 39, № 11. P. 4067–4079.
16. Zhong Y., Lall S.P., Shahidi F. Effects of oxidized dietary oil and vitamin E supplementation on lipid profile and oxidation of muscle and liver of juvenile atlantic cod (*Gadus morhua*). // *J. Agric. Food Chem.* 2007. Vol. 55, № 15. P. 6379–6386.
17. Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants // *Nahrung (Germany)*. 2000.
18. Shahidi F., Wanasundara U.N. Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils // *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2002. P. 387–403.
19. Gunstone F.D. Vegetable Oils // *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* / ed. Shahidi F. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
20. Schaich K.M. Lipid Oxidation: Theoretical Aspects // *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* / ed. Shahidi F. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
21. Dey S.S., Dora K.C. Suitability of chitosan as cryoprotectant on croaker fish (*Johnius gangeticus*) surimi during frozen storage // *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 6. P. 699–705.
22. Sun Q., Shen H., Luo Y. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin // *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 1. P. 53–60.
23. Sharma K.D. et al. Antioxidant capacity, polyphenolics and pigments of broccoli-cheese powder blends // *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 4. P. 510–514.
24. Nwanguma B.C. et al. Toxicity of oxidized fats II: Tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized corn oil diet // *Food Chem. Toxicol.* 1999. Vol. 37, № 4. P. 413–416.
25. EFSA. Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption . 2010. Vol. 8, № 10. 1-48 p.

26. Sachindra N.M. et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds // *J. Food Sci. Technol.* 2010. Vol. 47, № 1. P. 94–99.
27. Swapna H.C. et al. Lipid classes and fatty acid profile of selected Indian fresh water fishes // *J. Food Sci. Technol.* 2010. Vol. 47, № 4. P. 394–400.
28. Verma A.K., Banerjee R. Dietary fibre as functional ingredient in meat products: A novel approach for healthy living - A review // *J. Food Sci. Technol.* 2010. Vol. 47, № 3. P. 247–257.
29. Warhadpande R.M. et al. Effect of incorporation of chicken blood plasma on physico-chemical properties of cakes // *J. Food Sci. Technol.* 2010. Vol. 47, № 6. P. 693–696.
30. Kumar D., Tanwar V.K. Effects of incorporation of ground mustard on quality attributes of chicken nuggets // *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 6. P. 759–762.
31. Nergiz C., Çelikkale D. The effect of consecutive steps of refining on squalene content of vegetable oils // *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 3. P. 382–385.
32. Smith J., Charter E. Edited by Jim Smith and Edward Charter.
33. Rathina Raj K., Mahendrakar N.S. Effect of ensiling and organic solvents treatment on proteolytic enzymes of layer chicken intestine // *J. Food Sci. Technol.* 2010. Vol. 47, № 3. P. 320–324.
34. Pedrielli P., Skibsted L. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin,(-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate // *J. Agric. Food Chem.* 2002.
35. Kosanić M., Ranković B., Vukojević J. Antioxidant properties of some lichen species // *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 5. P. 584–590.
36. Bhattacharjee P. et al. A comparative qualitative study of the profile of volatile organic compounds associated with Salmonella contamination of packaged aged and fresh beef by HS-SPME/GC-MS // *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 1. P. 1–13.
37. Sarangi B.K. et al. Purification of alkaline protease from chicken intestine by aqueous two phase system of polyethylene glycol and sodium citrate // *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 1. P. 36–44.

38. Cesa S. et al. Influence of fat extraction methods on the peroxide value in infant formulas // *Food Res. Int.* 2012. Vol. 48, № 2. P. 584–591.
39. Эмануэль Н., Лясковская Ю. Торможение процессов окисления жиров. 1961.
40. Эмануэль Н., Заиков Г. Цепные реакции: Исторический аспект. 1989.
41. Эмануэль Н., Гагарина А. Критические явления в цепных вырожденно-разветвленных реакциях // *Успехи химии.* 1966.
42. Эмануэль Н. Химическая и биологическая кинетика // *Успехи химии.* 1981.
43. Обухова Л., Эмануэль Н. Роль свободнорадикальных реакций окисления в молекулярных механизмах старения живых организмов // *Успехи химии.* 1983.
44. Эмануэль Н., Гал Д. Окисление этилбензола: модельная реакция. 1984.
45. Эмануэль Н., Заиков Г., Майзус З. Роль среды в радикально-цепных реакциях окисления органических соединений. 1973.
46. Эмануэль Н., Бучаченко А. Химическая физика молекулярного разрушения и стабилизации полимеров. 1988.
47. Эмануэль Н., Бучаченко А. Химическая физика старения и стабилизации полимеров. 1982.
48. Эмануэль Н., Денисов Е., Майзус З. Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе. 1965.
49. Эмануэль Н., Кнорре Д. Курс химической кинетики. 1984.
50. Wasternack C., Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany.* // *Ann. Bot.* 2013. Vol. 111, № 6. P. 1021–1058.
51. Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases—structure and reaction mechanism // *Phytochemistry.* 2009.
52. Andreou A., Brodhun F., Feussner I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. // *Prog. Lipid Res.* 2009. Vol. 48, № 3-4. P. 148–170.

53. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 1. P. 27–30.
54. Kanehisa M. et al. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № Database issue. P. D199–D205.
55. Billek G. Heated oils - chemistry and nutritional aspects. // *Nutr. Metab.* 1980. Vol. 24 Suppl 1. P. 200–210.
56. Billek G. Health aspects of thermoxidized oils and fats // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000. Vol. 102. P. 587–593.
57. Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation // *Am. J. Clin. Nurs.* 1993. Vol. 57, № Suppl. P. 779S – 786S.
58. Izaki Y., Yoshikawa S., Uchiyama M. Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats // *Lipids.* 1984. Vol. 19, № 5. P. 324–331.
59. Kubow S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods // *Free Radic. Biol. Med.* 1992. Vol. 12, № 1. P. 63–81.
60. Eckl P.M., Ortner A., Esterbauer H. Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1993. Vol. 290, № 2. P. 183–192.
61. Ishikawa T., Esterbauer H., Sies H. Role of cardiac glutathione transferase and of the glutathione S-conjugate export system in biotransformation of 4-hydroxynonenal in the heart. // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261, № 4. P. 1576–1581.
62. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. Vol. 11, № 1. P. 81–128.
63. Schaur, R. J.; Zollner, H.; Esterbauer H. Biological effects of aldehydes with particular attention to 4-hydroxynonenal and malonaldehyde // *Membrane lipid oxidation* / ed. Vigo-Pelfrey C. CRC Press, 1991. P. 141–163.
64. Vladimirov Y. *Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology* / ed. Nohl H., Esterbauer H. Richelieu Press, 1994.
65. Gomes, R., Meek, M. E., Eggleton E. *Concise International Chemical Assessment Document 42: Bromoethane* // *Concise International Chemical Assessment Document 43: Acrolein.* Geneva, 2002. № 43.

66. Feussner I., Wasternack C. The lipoxygenase pathway. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. Vol. 53. P. 275–297.
67. Oarada M. et al. The effect of dietary lipid hydroperoxide on lymphoid tissues in mice. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. Vol. 960, № 2. P. 229–235.
68. Indart A. et al. Teratogenic actions of thermally-stressed culinary oils in rats. // *Free Radic. Res.* 2002. Vol. 36, № 10. P. 1051–1058.
69. Nishikawa A., Sodum R., Chung F. trans-5-Hydroxy-2-nonenal. 1992. P. 54–58.
70. Draper H.H., Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. 1990. Vol. 20, № 9. P. 901–907.
71. Tabee E., Jägerstad M., Dutta P.C. Frying Quality Characteristics of French Fries Prepared in Refined Olive Oil and Palm Olein // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009. Vol. 86, № 9. P. 885–893.
72. Stevenson S.G., Vaisey-Genser M., Eskin N.A.M. Quality control in the use of deep frying oils // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1984. Vol. 61, № 6. P. 1102–1108.
73. Schilmiller A.L., Koo A.J.K., Howe G.A. Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. // *Plant Physiol.* 2007. Vol. 143, № 2. P. 812–824.
74. Bassan A. et al. Reports on toxicokinetics , toxicity and allergenicity data on substances to be evaluated as acceptable previous cargoes for edible fats and oils SCIENTIFIC REPORT submitted to EFSA Lot 1 - Vertebrate and Mammalian toxicology : Reports on toxicokinetics , 2012. P. 1–759.
75. Gutierrez R.G.-Q., Dobarganes M.C. Analytical Procedures for the Evaluation of Used Frying Fats. // *Frying of Food. Principles.Changes. New Approaches.* / ed. Varela G. Chichester, England., 1988. P. pp 14 1–154.
76. Eder E. et al. Mutagenicity of beta-alkyl substituted acrolein congeners in the Salmonella typhimurium strain TA100 and genotoxicity testing in the SOS chromotest. // *Environ. Mol. Mutagen.* 1992. Vol. 19, № 4. P. 338–345.
77. Eder E., Schuler D., Budiawan. Cancer risk assessment for crotonaldehyde and 2-hexenal: an approach. // *IARC Sci. Publ.* 1999. № 150. P. 219–232.

78. Eder E., Schuler D. An approach to cancer risk assessment for the food constituent 2-hexenal on the basis of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenal in vivo. // Arch. Toxicol. 2000. Vol. 74, № 10. P. 642–648.
79. Draminski W., Eder E., Henschler D. A new pathway of acrolein metabolism in rats. // Arch. Toxicol. 1983. Vol. 52, № 3. P. 243–247.
80. Nolen G. a, Alexander J.C., Artman N.R. Long-term rat feeding study with used frying fats. // J. Nutr. 1967. Vol. 93, № 3. P. 337–348.
81. Nolen G. A feeding study of a used, partially hydrogenated soybean oil, frying fat in dogs. // J. Nutr. 1973. Vol. 103, № 9. P. 1248–1255.
82. Меньщикова Е., Ланкин В., Зенков Н. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты // М. Фирма «Слово. 2006.
83. Schaich K. Lipid oxidation: theoretical aspects // Bailey's Ind. oil fat Prod. 2005.
84. Bolland J.L., Koch H.P. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part IX. The primary thermal oxidation product of ethyl linoleate // J. Chem. Soc. The Royal Society of Chemistry, 1945. P. 445.
85. Farmer E.H., Koch H.P., Sutton D.A. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part VII. Rearrangement of double bonds during autoxidation // J. Chem. Soc. The Royal Society of Chemistry, 1943. P. 541.
86. Воробьева И., Байков В. Влияние различных соединений железа, введенных в состав обогащенной витаминами пшеничной муки, на ее липидный комплекс в процессе хранения // Вопросы питания. 2009. Vol. 78, № 6. P. 67–72.
87. Smith P., Waters W. Oxidations of organic compounds by cobaltic salts. Part XII. Oxidations of unsaturated acids // J. Chem. Soc. B Phys. 1969.
88. Lundberg W., Chipault J. The Oxidation of Methyl Linoleate at Various Temperatures1 // ... Am. Chem. Soc. 1947.
89. Cruz Castillo M. et al. Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in Arabidopsis. // Plant Physiol. 2004. Vol. 135, № 1. P. 85–94.

90. Truman W. et al. Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 3. P. 1075–1080.
91. Hamberg M. Hidden stereospecificity in the biosynthesis of divinyl ether fatty acids. // *FEBS J.* 2005. Vol. 272, № 3. P. 736–743.
92. Hamberg M. et al. Activation of the fatty acid alpha-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. Formation of oxylipins protecting against cell death. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 51. P. 51796–51805.
93. Creelman R.A., Mulpuri R. The oxylipin pathway in Arabidopsis. // *Arabidopsis Book.* 2002. Vol. 1. P. e0012.
94. Blée E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense // *Trends Plant Sci.* 2002. Vol. 7, № 7. P. 315–321.
95. Savchenko T. V, Zastrijnaja O.M., Klimov V. V. Oxylipins and plant abiotic stress resistance. // *Biochem. Biokhimiia.* 2014. Vol. 79, № 4. P. 362–375.
96. Koo A.J.K., Howe G.A. The wound hormone jasmonate. // *Phytochemistry.* 2009. Vol. 70, № 13-14. P. 1571–1580.
97. Rosahl S., Feussner I. Oxylipins // *Plant Lipids: Biology, Utilisation and Manipulation* / ed. Murphy D.J. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. P. 328–354.
98. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. // *Ann. Bot.* 2007. Vol. 100, № 4. P. 681–697.
99. Jahn U., Galano J.-M., Durand T. Beyond prostaglandins--chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathways from polyunsaturated fatty acids. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008. Vol. 47, № 32. P. 5894–5955.
100. Tsitsigiannis D.I., Keller N.P. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. // *Trends Microbiol.* Elsevier, 2007. Vol. 15, № 3. P. 109–118.
101. Browse J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. // *Annu. Rev. Plant Biol. Annual Reviews*, 2009. Vol. 60. P. 183–205.

102. Kahn R.A., Durst F. Function and evolution of plant cytochrome P450 // *Evolution of Metabolic Pathways* / ed. Romeo J. Pergamon Press, 2000. P. 151–189.
103. Saffert A. et al. A dual function alpha-dioxygenase-peroxidase and NAD(+) oxidoreductase active enzyme from germinating pea rationalizing alpha-oxidation of fatty acids in plants. // *Plant Physiol.* 2000. Vol. 123, № 4. P. 1545–1552.
104. Kato T. et al. Abnormal Catabolites of Unsaturated Fatty Acids by In Vitro Reaction of Crude Enzyme from Infected Higher Plants. // *Chem. Lett. The Chemical Society of Japan*, 1994. № 4. P. 761–762.
105. Kühn H. et al. Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. // *Eicosanoids.* 1991. Vol. 4, № 1. P. 9–14.
106. Noordermeer M.A., Veldink G.A., Vliegthart J.F. Spectroscopic studies on the active site of hydroperoxide lyase; the influence of detergents on its conformation. // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 489, № 2-3. P. 229–232.
107. Grechkin A. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. // *Prog. Lipid Res.* 1998. Vol. 37, № 5. P. 317–352.
108. Ziegler J. et al. Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 25. P. 19132–19138.
109. Smith W.L., Murphy R.C. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* // *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* Elsevier, 2016. 259-296 p.
110. Gardner H. Sequential enzymes of linoleic acid oxidation in corn germ: lipoxygenase and linoleate hydroperoxide isomerase // *J. Lipid Res.* 1970.
111. Guss P., Richardson T., Stahmann M. Oxidation of various lipid substrates with unfractionated soybean and wheat lipoxidase // *J. Am. Oil* 1968.
112. Shen N. et al. Oxidative stabilities of soybean oils that lack lipoxygenases // *J. Am. Oil* 1996.
113. Лисицын А. Развитие теоретических основ процесса окисления растительных масел и разработка рекомендаций по повышению их стабильности к окислению // *дис.... д-ра техн. наук.* 2006.
114. Frankel E.N. *Lipid Oxidation* // *Lipid Oxidation.* Elsevier, 2012. 299-354 p.

115. Kalua C.M. et al. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review // *Food Chem.* 2007. Vol. 100, № 1. P. 273–286.
116. White P.J. Methods for measuring changes in deep-fat frying oils // *Food Technol.* 1991.
117. Lumley L. Polar Compounds in Heated Oils // *Frying of Food. Principles. Changes, New Approaches.* / ed. Varela G. 1988. P. 166–173.
118. Методические рекомендации по организации контроля качества фритюрных жиров на предприятиях питания. 2006.
119. Wanten G.J. a, Janssen F.P., Naber a. H.J. Saturated triglycerides and fatty acids activate neutrophils depending on carbon chain-length // *Eur. J. Clin. Invest.* 2002. Vol. 32, № 4. P. 285–289.
120. Johansson A.-S. et al. Docosahexaenoic acid stabilizes soluble amyloid-beta protofibrils and sustains amyloid-beta-induced neurotoxicity in vitro. // *FEBS J.* 2007. Vol. 274, № 4. P. 990–1000.
121. Roseth S., Fykse E.M., Fonnum F. The effect of arachidonic acid and free fatty acids on vesicular uptake of glutamate and γ -aminobutyric acid // *Eur. J. Pharmacol.* 1998. Vol. 341, № 2-3. P. 281–288.
122. RTECS. RTECS file. RTECS number: RF9990000.
123. Appel M.J., van Garderen-Hoetmer A., Woutersen R.A. Effects of dietary linoleic acid on pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters. // *Cancer Res.* 1994. Vol. 54, № 8. P. 2113–2120.
124. Black P.N. The prevalence of allergic disease and linoleic acid in the diet. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999. Vol. 103, № 2 Pt 1. P. 351–352.
125. CCRIS (Chemical Carcinogenesis Research Information System), online. [Electronic resource]. URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS>. (accessed: 11.05.2011).
126. Coyral-Castel S. et al. Effects of unsaturated fatty acids on progesterone secretion and selected protein kinases in goat granulosa cells. // *Domest. Anim. Endocrinol.* 2010. Vol. 38, № 4. P. 272–283.
127. Cury-Boaventura M.F., Pompéia C., Curi R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. // *Clin. Nutr.* 2004. Vol. 23, № 4. P. 721–732.

128. Cury-Boaventura M.F., Pompéia C., Curi R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Raji cells. // *Nutrition*. 2005. Vol. 21, № 3. P. 395–405.
129. Kankaanpää P. et al. Dietary fatty acids and allergy. // *Ann. Med.* 1999. Vol. 31, № 4. P. 282–287.
130. Mamalakis G., Kafatos A., Board S. Type A behavior and adipose tissue linoleic acid: implications for stress management. // *J. Am. Coll. Nutr.* 1994. Vol. 13, № 3. P. 292–297.
131. Matsuoka T. et al. Elevated dietary linoleic acid increases gastric carcinoma cell invasion and metastasis in mice. // *Br. J. Cancer*. 2010. Vol. 103, № 8. P. 1182–1191.
132. Parnas M., Peters M., Minke B. Linoleic acid inhibits TRP channels with intrinsic voltage sensitivity: Implications on the mechanism of linoleic acid action. // *Channels (Austin)*. Vol. 3, № 3. P. 164–166.
133. Sammon A.M. Dietary linoleic acid, immune inhibition and disease. // *Postgrad. Med. J.* 1999. Vol. 75, № 881. P. 129–132.
134. Teshima R. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on calcium response and degranulation from RBL-2H3 cells. // *Int. Immunopharmacol.* 2007. Vol. 7, № 2. P. 205–210.
135. Tezabwala B.U., Bennett M., Grundy S.M. Immunotoxicity of polyunsaturated fatty acids in serum-free medium. // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1995. Vol. 17, № 2. P. 365–383.
136. Final Report on the Safety Assessment of Oleic Acid, Lauric Acid, Palmitic Acid, Myristic Acid, and Stearic Acid // *Int. J. Toxicol.* 1987. Vol. 6, № 3. P. 321–401.
137. RTECS. file. RTECS number: OE9800000.
138. DHI M.L. and P.T.K. (PKT) L. Appendix 2 - Review of Annex IV of the Regulation No. 1907/2006 (REACH) - Evaluation of existing entries. Final [Electronic resource]. 2008. URL: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/pdf/6_report_an_4.pdf (accessed: 04.08.2015).
139. Weatherill A.R. et al. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. // *J. Immunol.* 2005. Vol. 174, № 9. P. 5390–5397.

140. Lee J.Y. et al. Saturated Fatty Acid Activates but Polyunsaturated Fatty Acid Inhibits Toll-like Receptor 2 Dimerized with Toll-like Receptor 6 or 1 // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 17. P. 16971–16979.
141. Demarne Y. et al. Effects of prolonged ingestion of dodecanoic or lauric acid on the secretion of fatty acids in the rat mammary gland. // *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* 1977. Vol. 285, № 1. P. 69–71.
142. Clark W.L., Serbia G.W. Safety aspects of frying fats and oils // *Food Technol.* 1991.
143. Bull A.W., Nigro N.D., Marnett L.J. Structural requirements for stimulation of colonic cell proliferation by oxidized fatty acids. // *Cancer Res.* 1988. Vol. 48, № 7. P. 1771–1776.
144. Abraham K. et al. Toxicology and risk assessment of acrolein in food. // *Mol. Nutr. Food Res.* 2011. Vol. 55, № 9. P. 1277–1290.
145. Liu X., Zhu M., Xie J. Mutagenicity of acrolein and acrolein-induced DNA adducts. // *Toxicol. Mech. Methods.* 2010. Vol. 20, № 1. P. 36–44.
146. Parent R.A., Caravello H.E., Hoberman A.M. Reproductive study of acrolein on two generations of rats. // *Fundam. Appl. Toxicol.* 1992. Vol. 19, № 2. P. 228–237.
147. Parent R.A. et al. Developmental toxicity of acrolein in New Zealand white rabbits. // *Fundam. Appl. Toxicol.* 1993. Vol. 20, № 2. P. 248–256.
148. Parent R.A., Caravello H.E., Long J.E. Two-year toxicity and carcinogenicity study of acrolein in rats. // *J. Appl. Toxicol.* 1992. Vol. 12, № 2. P. 131–139.
149. Auerbach S.S. et al. A comparative 90-day toxicity study of allyl acetate, allyl alcohol and acrolein. // *Toxicology.* 2008. Vol. 253, № 1-3. P. 79–88.
150. Faroon O. et al. Acrolein health effects. // *Toxicol. Ind. Health.* 2008. Vol. 24, № 7. P. 447–490.
151. Parent R.A. et al. Metabolism and distribution of [2,3-¹⁴C]acrolein in Sprague-Dawley rats. II. Identification of urinary and fecal metabolites. // *Toxicol. Sci.* 1998. Vol. 43, № 2. P. 110–120.
152. Akubue P.I. et al. Excretion of malondialdehyde, formaldehyde, acetaldehyde, acetone and methyl ethyl ketone in the urine of rats given an acute dose of malondialdehyde // *Arch. Toxicol.* 1994. Vol. 68, № 5. P. 338–341.

153. Bird R.P., Draper H.H., Valli V.E. Toxicological evaluation of malonaldehyde: a 12-month study of mice. // *J. Toxicol. Environ. Health*. 1982. Vol. 10, № 6. P. 897–905.
154. Crawford D.L. et al. Acute toxicity of malonaldehyde. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1965. Vol. 7, № 6. P. 826–832.
155. Piche L.A. et al. Identification of N-epsilon-(2-propenal)lysine as the main form of malondialdehyde in food digesta. // *Carcinogenesis*. 1988. Vol. 9, № 3. P. 473–477.
156. Piché L.A., Draper H.H., Cole P.D. Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs a concentrate of n-3 fatty acids. // *Lipids*. 1988. Vol. 23, № 4. P. 370–371.
157. Apaja M. Evaluation of toxicity and carcinogenicity of malonaldehyde. // No. 55 *Anatomica, Pathologica, Microbiologica* No. 8 (Oulu University of Oulu). 1980. P. 1–61.
158. Shamberger R.J., Andreone T.L., Willis C.E. Antioxidants and cancer. IV. Initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1974. Vol. 53, № 6. P. 1771–1773.
159. Siu G.M., Draper H.H., Valli V.E. Oral toxicity of malonaldehyde: a 90-day study on mice. // *J. Toxicol. Environ. Health*. 1983. Vol. 11, № 1. P. 105–119.
160. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Malonaldehyde, Sodium Salt (3-Hydroxy-2-propenal, Sodium Salt) (CAS No. 24382-04-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). // *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 1988. Vol. 331. P. 1–182.
161. Chan P.C. NTP toxicity studies of toxicity studies of 2,4-decadienal (CAS No. 25152-84-5) administered by gavage to F344/N Rats and B6C3F1 mice. // *Toxic. Rep. Ser.* 2011. № 76. P. 1–94.
162. Chang Y.-C., Lin P. Trans, trans-2,4-decadienal induced cell proliferation via p27 pathway in human bronchial epithelial cells. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008. Vol. 228, № 1. P. 76–83.
163. Chang L.W., Lo W.-S., Lin P. Trans, trans-2,4-decadienal, a product found in cooking oil fumes, induces cell proliferation and cytokine production due to reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells. // *Toxicol. Sci.* 2005. Vol. 87, № 2. P. 337–343.

164. Cabré A. et al. Cytotoxic effects of the lipid peroxidation product 2,4-decadienal in vascular smooth muscle cells. // *Atherosclerosis*. 2003. Vol. 169, № 2. P. 245–250.
165. Girona J. et al. 2,4-Decadienal downregulates TNF-alpha gene expression in THP-1 human macrophages. // *Atherosclerosis*. 2001. Vol. 158, № 1. P. 95–101.
166. Young S.-C. et al. DNA damages induced by trans, trans-2,4-decadienal (tt-DDE), a component of cooking oil fume, in human bronchial epithelial cells. // *Environ. Mol. Mutagen*. 2010. Vol. 51, № 4. P. 315–321.
167. Hung H.-S. et al. Association of cooking oil fumes exposure with lung cancer: involvement of inhibitor of apoptosis proteins in cell survival and proliferation in vitro. // *Mutat. Res*. 2007. Vol. 628, № 2. P. 107–116.
168. Romano G., Miralto A., Ianora A. Teratogenic effects of diatom metabolites on sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. // *Mar. Drugs*. 2010. Vol. 8, № 4. P. 950–967.
169. Dittberner U. et al. Genotoxic effects of 2-trans-hexenal in human buccal mucosa cells in vivo. // *Mutat. Res*. 1997. Vol. 390, № 1-2. P. 161–165.
170. Gölzer P. et al. (E)-2-hexenal-induced DNA damage and formation of cyclic 1,N2-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells. // *Chem. Res. Toxicol*. Vol. 9, № 7. P. 1207–1213.
171. Gaunt I.F. et al. Acute and short-term toxicity studies on trans-2-hexenal. // *Food Cosmet. Toxicol*. 1971. Vol. 9, № 6. P. 775–786.
172. Kiwamoto R., Rietjens I.M.C.M., Punt A. A physiologically based in silico model for trans-2-hexenal detoxification and DNA adduct formation in rat. // *Chem. Res. Toxicol*. 2012. Vol. 25, № 12. P. 2630–2641.
173. Stout M.D. et al. Toxicity, DNA binding, and cell proliferation in male F344 rats following short-term gavage exposures to trans-2-hexenal. // *Toxicol. Pathol*. 2008. Vol. 36, № 2. P. 232–246.
174. Ping P. et al. Cardiac toxic effects of trans-2-hexenal are mediated by induction of cardiomyocyte apoptotic pathways. // *Cardiovasc. Toxicol*. 2003. Vol. 3, № 4. P. 341–351.
175. Nádasi E. et al. Carcinogenic potential of trans-2-hexenal is based on epigenetic effect. // *In Vivo*. Vol. 19, № 3. P. 559–562.

176. Wu S.C., Yen G.C., Sheu F. Mutagenicity and identification of mutagenic compounds of fumes obtained from heating peanut oil. // *J. Food Prot.* 2001. Vol. 64, № 2. P. 240–245.
177. Viola P., Bianchi A. Clinical aspects of the frying of foods // *Frying of Food, Principles.* 1988.
178. Lamboni C., Sébédio J.-L., Perkins E.G. Cyclic fatty acid monomers from dietary heated fats affect rat liver enzyme activity // *Lipids.* 1998. Vol. 33, № 7. P. 675–681.
179. Martin J.-C. et al. Cyclic Fatty Acid Monomers from Heated Oil Modify the Activities of Lipid Synthesizing and Oxidizing Enzymes in Rat Liver // *J. Nutr.* 2000. Vol. 130, № 6. P. 1524–1530.
180. Iwaoka W.T., Perkins E.G. Nutritional effects of the cyclic monomers of methyl linolenate in the rat. // *Lipids.* 1976. Vol. 11, № 4. P. 349–353.
181. Gabriel H.G., Alexander J.C., Valli V.E. Nutritional and metabolic studies of distillable fractions from fresh and thermally oxidized corn oil and olive oil. // *Lipids.* 1978. Vol. 13, № 1. P. 49–55.
182. Lang K. et al. Ernährungsphysiologische eigenschaften von fritierfetten // *Steinkopff.* 1978. Vol. 21. P. 1–61.
183. Lamboni C., Perkins E.G. Effects of dietary heated fats on rat liver enzyme activity. // *Lipids.* 1996. Vol. 31, № 9. P. 955–962.
184. Narasimhamurthy K., Raina P.L. Long term feeding effects of heated and fried oils on lipids and lipoproteins in rats. // *Mol. Cell. Biochem.* 1999. Vol. 195, № 1-2. P. 143–153.
185. Chao P.-M. et al. A high oxidised frying oil content diet is less adipogenic, but induces glucose intolerance in rodents. // *Br. J. Nutr.* 2007. Vol. 98, № 1. P. 63–71.
186. Ringseis R. et al. Feeding oxidized fat during pregnancy up-regulates expression of PPARalpha-responsive genes in the liver of rat fetuses. // *Lipids Health Dis.* 2007. Vol. 6. P. 6.
187. Totani N. et al. Chemical properties and cytotoxicity of thermally oxidized oil. // *J. Oleo Sci.* 2008. Vol. 57, № 3. P. 153–160.
188. Chiang Y.-F. et al. Dietary oxidised frying oil causes oxidative damage of pancreatic islets and impairment of insulin secretion, effects associated with vitamin E deficiency. // *Br. J. Nutr.* 2011. Vol. 105, № 9. P. 1311–1319.

189. Huang C.-F. et al. Oxidized frying oil and its polar fraction fed to pregnant mice are teratogenic and alter mRNA expressions of vitamin A metabolism genes in the liver of dams and their fetuses. // *J. Nutr. Biochem.* 2014. Vol. 25, № 5. P. 549–556.
190. Lushchak V., Semchuk N. Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors // *Acta Physiol. Plant.* 2012.
191. Ramamurthi S., McCurdy A., Tyler R. Deodorizer distillate: A valuable byproduct // *Proc. World Conf. Oilseed Edible Oils Process.* 1998.
192. Naumov V., Vasil'ev R. Antioxidant and prooxidant effects of tocopherol // *Kinet. Catal.* 2003.
193. Frankel E., Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants // *J. Sci. Food* 2000.
194. Hamilton R., Kalu C., McNeill G. Effects of tocopherols, ascorbyl palmitate, and lecithin on autoxidation of fish oil // ... *Am. Oil* 1998.
195. Marinova E., Toneva A., Yanishlieva N. Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil // *Food Chem.* 2008.
196. Azizkhani M., Zandi P. Effects of some natural antioxidant mixtures on margarine stability // *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 2010. Vol. 69115, № 1. P. 93–96.
197. Saucier C.T., Waterhouse A.L. Synergetic activity of catechin and other antioxidants // *J. Agric. Food Chem.* 1999. Vol. 47, № 11. P. 4491–4494.
198. Liu D. et al. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical // *LWT - Food Sci. Technol.* 2008. Vol. 41, № 7. P. 1344–1349.
199. Guzman R. de et al. Synergistic effects of antioxidants on the oxidative stability of soybean oil-and poultry fat-based biodiesel // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009.
200. Gray J.I. Measurement of lipid oxidation: A review // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1978. Vol. 55, № 6. P. 539–546.
201. Velasco J. et al. Influence of two lipid extraction procedures on the peroxide value in powdered infant formulas // *Eur. Food Res. Technol.* 2008. Vol. 226, № 5. P. 1159–1166.

202. Minor W., S.J., S.B., O.Z., B.J.T., W.R., A.B. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. // *Biochemistry*. 1996. Vol. 35. P. 10687–10701.
203. ГОСТ Р 51487-99. Масла растительные и жиры животные. Метод определения перекисного числа. 1999.
204. ГОСТ 31756-2012 (ISO 6885:2006) Жиры и масла животные и растительные. Определение анизинового числа. 2014.
205. ISO 3656:2011 - Жиры и масла животные и растительные. Определение поглощения в ультрафиолетовом свете, выраженное в виде удельной экстинкции. 2011.
206. ГОСТ 31933-2012 Масла растительные. Методы определения кислотного числа, ГОСТ от 21 июня 2013 года №31933-2012. 2012.
207. Kitchen D.B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. Vol. 3, № 11. P. 935–949.
208. Kämper A. et al. Fully automated flexible docking of ligands into flexible synthetic receptors using forward and inverse docking strategies. // *J. Chem. Inf. Model.* Vol. 46, № 2. P. 903–911.
209. Stahl M. Modifications of the scoring function in FlexX for virtual screening applications // *Perspect. Drug Discov. Des.* Kluwer Academic Publishers. Vol. 20, № 1. P. 83–98.
210. Jacobsson M., Karlén A. Ligand bias of scoring functions in structure-based virtual screening. // *J. Chem. Inf. Model.* Vol. 46, № 3. P. 1334–1343.
211. Clark R.D. et al. Consensus scoring for ligand/protein interactions. // *J. Mol. Graph. Model.* 2002. Vol. 20, № 4. P. 281–295.
212. Feher M. Consensus scoring for protein-ligand interactions. // *Drug Discov. Today.* 2006. Vol. 11, № 9-10. P. 421–428.
213. Lushchak V.I., Semchuk N.M. Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors // *Acta Physiol. Plant.* 2012. Vol. 34, № 5. P. 1607–1628.
214. Hamilton R.J. et al. Effects of tocopherols, ascorbyl palmitate, and lecithin on autoxidation of fish oil // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1998. Vol. 75, № 7. P. 813–822.

215. Meyer A.S., Jacobsen C. Fate of the synergistic antioxidant system ascorbic acid, lecithin, and tocopherol in mayonnaise: partition of ascorbic acid // *J. Food Lipids*. 1996. Vol. 3, № 2. P. 139–147.
216. Doert M. et al. Synergistic effect of lecithins for tocopherols: lecithin-based regeneration of α -tocopherol // *Eur. Food Res. Technol.* 2012. Vol. 235, № 5. P. 915–928.
217. Bandarra N.M. et al. Antioxidant synergy of α -tocopherol and phospholipids // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999. Vol. 76, № 8. P. 905–913.
218. Shimajiri J. et al. Synergistic antioxidant activity of milk sphingomyeline and its sphingoid base with α -tocopherol on fish oil triacylglycerol. // *J. Agric. Food Chem. American Chemical Society*, 2013. Vol. 61, № 33. P. 7969–7975.
219. Mazaletskaia L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N. Effect of lecithin on the inhibitory efficiency of alpha-tocopherol during methyl oleate oxidation. // *Biofizika*. 2010. Vol. 55, № 1. P. 25–31.
220. Reblova Z., Pokorny J., Panek J. Autoxidation of stored soybean lecithin // *Food / Nahrung*. 1991. Vol. 35, № 6. P. 665–666.
221. El-Din Saad El-Beltagi H., Amin Mohamed A. Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (*Brassica napus* L.) cultivars // *Grasas y Aceites*. 2010. Vol. 61, № 2. P. 143–150.
222. Kaushik N., Vir S. Variations in fatty acid composition of neem seeds collected from the Rajasthan state of India. // *Biochem. Soc. Trans.* 2000. Vol. 28, № 6. P. 880–882.
223. LC-PUFA-enriched oil production by microalgae: accumulation of lipid and triacylglycerols containing n-3 LC-PUFA is triggered by nitrogen limitatio... - PubMed - NCBI [Electronic resource]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24177672> (accessed: 25.09.2015).
224. Expert Consultation. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. // *FAO food and nutrition paper*. 2008. Vol. 91. 180 p.
225. Grilo E.C. et al. Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils // *Food Sci. Technol. SBCTA*, 2014. Vol. 34, № 2. P. 379–385.

226. Yang J., Xiong Y.L. Inhibition of Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions by Interface-Adsorbed Myofibrillar Protein. // *J. Agric. Food Chem.* American Chemical Society, 2015. Vol. 63, № 40. P. 8896–8904.
227. Ke P.J., Ackman R.G. Bunsen coefficient for oxygen in marine oils at various temperatures determined by an exponential dilution method with a polarographic oxygen electrode // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1973. Vol. 50, № 11. P. 429–435.
228. McClements D.J., Decker E.A. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems // *J. Food Sci.* 2000. Vol. 65, № 8. P. 1270–1282.
229. Wisastra R. et al. Anacardic acid derived salicylates are inhibitors or activators of lipoxygenases. // *Bioorg. Med. Chem.* 2012. Vol. 20, № 16. P. 5027–5032.
230. Whitman S. et al. Structure-activity relationship studies of nordihydroguaiaretic acid inhibitors toward soybean, 12-human, and 15-human lipoxygenase. // *J. Med. Chem.* 2002. Vol. 45, № 12. P. 2659–2661.
231. Wecksler A.T., Garcia N.K., Holman T.R. Substrate specificity effects of lipoxygenase products and inhibitors on soybean lipoxygenase-1. // *Bioorg. Med. Chem.* 2009. Vol. 17, № 18. P. 6534–6539.
232. Ribeiro D. et al. Inhibition of LOX by flavonoids: a structure-activity relationship study. // *Eur. J. Med. Chem.* 2014. Vol. 72. P. 137–145.
233. Rao P.N.P., Chen Q.-H., Knaus E.E. Synthesis and structure-activity relationship studies of 1,3-diarylprop-2-yn-1-ones: dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. // *J. Med. Chem.* 2006. Vol. 49, № 5. P. 1668–1683.
234. Siskou I.C. et al. Design and study of some novel ibuprofen derivatives with potential nootropic and neuroprotective properties. // *Bioorg. Med. Chem.* 2007. Vol. 15, № 2. P. 951–961.
235. Rao P.N.P., Chen Q.-H., Knaus E.E. Synthesis and biological evaluation of 1,3-diphenylprop-2-yn-1-ones as dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005. Vol. 15, № 21. P. 4842–4845.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Свидетельство о государственной регистрации базы данных (справочное)

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации базы данных
№ 2015620490

База данных химического состава растительных масел и животных жиров

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт питания" (RU)*

Авторы: *Саркисян Варужан Амбарцумович (RU), Глазкова Ирина Владимировна (RU), Кочеткова Алла Алексеевна (RU), Смирнова Елена Александровна (RU), Зорина Елена Евгеньевна (RU), Воробьева Ирина Сергеевна (RU), Воробьева Валентина Матвеевна (RU)*

Заявка № **2014621466**
Дата поступления **30 октября 2014 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных **17 марта 2015 г.**



Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Л.Л. Кирий

Приложение Б. Акт внедрения научно-исследовательских и технологических работ (справочное)

Согласовано

Заместитель директора
ФГБУ «НИИ питания» РАМН,
кандидат наук, профессор



Шпаров М.М.Г.

2013 г.

Утверждаю

Генеральный директор
ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты»
Самченко К.В.



2013 г.

Акт внедрения

результатов научно-исследовательских
и технологических работ

Настоящим актом подтверждаем, что в период с 17.09.2013 по 20.09.2013 г.г. в производственных условиях ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты» (РФ, 309850, Белгородская область, г. Алексеевка, ул. Фрунзе, д. 4) была осуществлена выработка опытных партий растительно-жировых спредов (9 рецептур), разработанных Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-исследовательский институт питания» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИ питания» РАМН) в соответствии с темой «Медико-биологическое обоснование и разработка рецептуры спредов, поддерживающих здоровье потребителей в возрасте старше 40 лет (40+)», входящей в раздел исследований «Выбор и обоснование составов спредов функционального назначения» темы № 124 «Медико-биологическое обоснование и разработка технологии функциональных пищевых продуктов, обеспечивающей качество и регламентируемое содержание биологически активных ингредиентов».

Основанием для проведения производственных испытаний явился договор о научно-техническом сотрудничестве между ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты» и ФГБУ «НИИ питания» РАМН от 11.03.2013 г., заключенный с целью внедрения в производство научно-исследовательских и технологических разработок, отвечающей плану мероприятий по реализации «Основ государственной политики в области здорового питания населения на период до 2020 года».

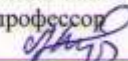
Настоящим актом подтверждается факт внедрения результатов НИР, выполненных в рамках научно-исследовательской темы № 124.

Результатом внедрения являются 9 опытных партий (по 15 кг каждая) растительно-жирового спреда со сбалансированным жирнокислотным составом, предназначенного для употребления в пищу в качестве источника полиненасыщенных жирных кислот семейства омега-3, в частности, альфа-линоленовой кислоты, и растительных фитостеролов.

Выработанная продукция по санитарно-химическим и гигиеническим показателям соответствует действующим нормативным документам.

От ФГБУ «НИИ питания» РАМН

Зав. лабораторией технологии новых
специализированных продуктов
профилактического действия,
д.т.н., профессор


« 10 » 2013 г.

Кочеткова А.А.
2013 г.

**От ООО «ЭФКО Пищевые
Ингредиенты»**

Главный технолог


« 04 » 2013 г.

Приложение В. Справка об участии в разработке проекта национального стандарта (справочное)



**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕРТИФИКАЦИИ
ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
(ОАО "ВНИИС")**



Электрический пер., д.3/10, строение 1,
г. Москва, 123557

Телефон: (499) 253 70 06 Факс: (499) 253 51 35
<http://www.vniis.ru> E-mail: vniis@vniis.ru

№ 402-311 от «16» января 2015 г.

СПРАВКА

Выдана Саркисяну Варужану Амбарцумовичу, научному сотруднику лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт питания» о том, что в 2014 году он принимал участие в разработке проекта национального стандарта ГОСТ Р 54607.3-2014 «Услуги общественного питания. Методы лабораторного контроля продукции общественного питания. Часть 3. Методы контроля соблюдения процессов изготовления продукции общественного питания» (шифр темы 1.7.347-1.005.13).

Работы проводились в рамках государственного контракта с РОССТАНДАРТОМ по теме: «Разработка и подготовка к утверждению стандартов на пищевую продукцию и методы ее испытаний» (Лот. 2.14) № 130-196 от 27.05.2013 г.

Генеральный директор

В.Г. Версан




8-499-253-01-11
Е.А. Лежнина

Система качества ВНИИС сертифицирована

Приложение Г. Заявка на патент РФ на изобретение (справочное)

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2011

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

 «Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993

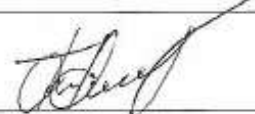
Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПОСТУПЛЕНИИ ЗАЯВКИ

05.12.2014 <i>Дата поступления</i>	078694 <i>Входящий №</i>	2014148929 <i>Регистрационный №</i>
--	------------------------------------	---

(1) ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ оригинала ВОЗМЩЕНО заявки - 5 ДЕК 2014 ФИПС ОТД 117		(2) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ № (3) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки (с приоритетную дату)	ВХОДЯЩИЙ № АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (только почтовый адрес, не указывать индекс) 109240, Москва, Устьинский проезд, д.2/14 Телефон: 8(495)-698-53-89 Факс: 8(495)-698-53-89 E-mail: kochetkova@fips.ru
<input type="checkbox"/> (86) (защитительский номер международной заявки в деле международной заявки, указываемый при переводе на русский язык)	<input type="checkbox"/> (87) (номер в деле международной заявки для международной заявки)	АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ (только почтовый адрес, не указывать индекс)	
ЗАЯВЛЕНИЕ в выдаче патента Российской Федерации на изобретение		В Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Бережковская наб., 30, корп.1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993	
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Специализированный липидный модуль			
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (указывается полное имя или наименование (полное наименование организации) лица, являющегося заявителем, а также возможные сведения о его юридическом адресе) Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт питания» (ФГБНУ «НИИ питания»)		ОГРН 1027739311907 КОД страны по стандарту ВИС СТ. 3 (если он указывается)	
Российская Федерация, 109240, Москва, Устьинский проезд, д.2 /14 Укажите вид контракта: <input type="checkbox"/> государственному заказчику <input type="checkbox"/> научно-исследовательскому учреждению <input checked="" type="checkbox"/> исполнителю работ по <input checked="" type="checkbox"/> государственному <input type="checkbox"/> муниципальному контракту. источник работ Российский научный фонд грант от «20» июня 2014 г. № 14-16-00055		Является: <input type="checkbox"/> Перечислен(а) <input type="checkbox"/> Автор(ами) <input type="checkbox"/> Иные Факс: E-mail:	
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ Укажите(те) имя(а) лица(лиц) (наименование(а) организации(организаций) для выдачи акт(ов) по патентному делу в отношении) лица в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам		Репрезентаций(и) номер (и) патентной(ых) заявочной(их)	
Среды представительства (указывается в случае, если заявитель или представитель не предоставили договоренность)			

Всего листов: 40 лист 1

Количество листов	40	Фамилия лица, принявшего документы Абдулова Т.Р. 
Количество документов, подтверждающих уплату пошлины	1	
Количество изображений	0	

**Приложение Д. Типовые взаимодействия в фермент-лигандных комплексах
(обязательное)**

Антоцианидины

№	Лиганд	ΔG , кДж/моль	ЭЛ, ккал/моль	Предполагаемый механизм взаимодействия
1	Аурантинидин	-1	0,01	
2	Цианидин	-14	0,16	
3	Дельфинидин	-12	0,13	

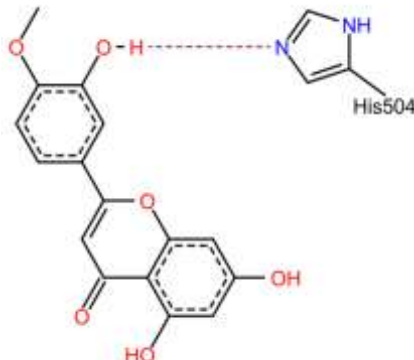
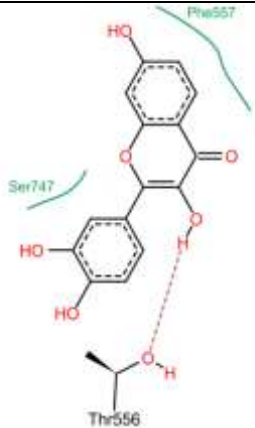
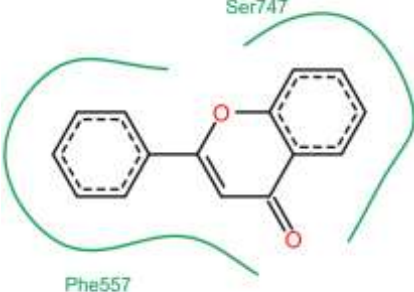
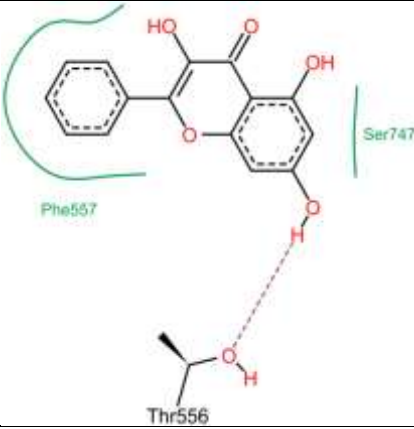
4 Мальвидин	-6	0,06	<p>Chemical structure of Malvidin (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidene-2-naphthol) is shown. The naphthalene ring is protonated at the 1-position. Interactions are indicated by dashed red lines: Thr556 (threonine) interacts with the protonated oxygen, and Ser747 (serine) interacts with the hydroxyl group at the 4-position. Phe557 (phenylalanine) is shown nearby with a green wavy line indicating its proximity to the structure.</p>
5 Пеларгонидин	-6	0,07	<p>Chemical structure of Pelargonidin (4-hydroxybenzylidene-2-naphthol) is shown. The naphthalene ring is protonated at the 1-position. Interactions are indicated by dashed red lines: Thr556 (threonine) interacts with the protonated oxygen, and Ser747 (serine) interacts with the hydroxyl group at the 4-position. Phe557 (phenylalanine) is shown nearby with a green wavy line indicating its proximity to the structure.</p>
6 Пеонидин	-10	0,11	<p>Chemical structure of Peonidin (3,5-dihydroxybenzylidene-2-naphthol) is shown. The naphthalene ring is protonated at the 1-position. Interactions are indicated by dashed red lines: Thr556 (threonine) interacts with the protonated oxygen, and Ser747 (serine) interacts with the hydroxyl group at the 4-position. Phe557 (phenylalanine) is shown nearby with a green wavy line indicating its proximity to the structure.</p>
7 Петунидин	-13	0,13	<p>Chemical structure of Petunidin (3,4,5-trihydroxybenzylidene-2-naphthol) is shown. The naphthalene ring is protonated at the 1-position. Interactions are indicated by dashed red lines: Thr556 (threonine) interacts with the protonated oxygen, and Ser747 (serine) interacts with the hydroxyl group at the 4-position. Phe557 (phenylalanine) is shown nearby with a green wavy line indicating its proximity to the structure.</p>

8	Розинидин	-14	0,15	
---	-----------	-----	------	--

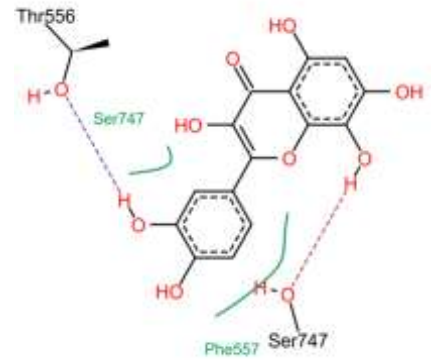
Антоксантины

№	Лиганд	ΔG , кДж/моль	LE, ккал/моль	Предполагаемый механизм связывания
1	5-О- Деметилинобилетин	—	—	—
2	Акацетин	-13	0,15	
3	Апигенин	—	—	—
4	Байкалеин	-21	0,5	

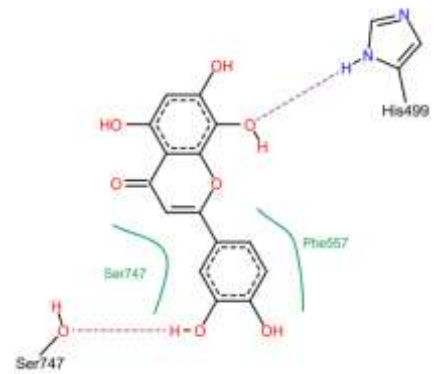
5	Байкалин	-18	0,13	
6	Хризин	-30	0,3	
7	Циреимаритин	-18	0,19	
8	Цирсилиол	—	—	—
9	Цинарозид	—	—	—
10	Датисцетин	-12	0,14	

1 1	Диосметин	-28	0,3	
1 2	Диосмин	—	—	—
1 3	Физетин	-11	0,13	
1 4	Флавон	-14	0,19	
1 5	Галангин	-15	0,18	
1 6	Гарденин D	—	—	—
1	Гиепидулин	—	—	—

1
8 Госсипетин -20 0,21

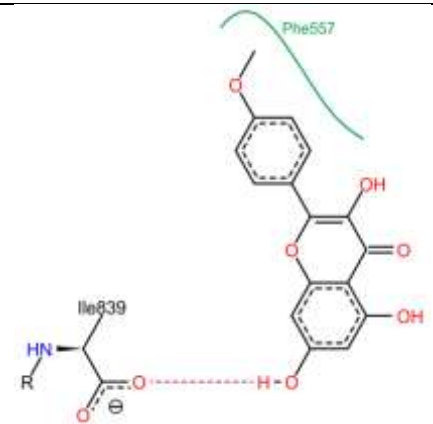


1
9 Гиполактин -11 0,11



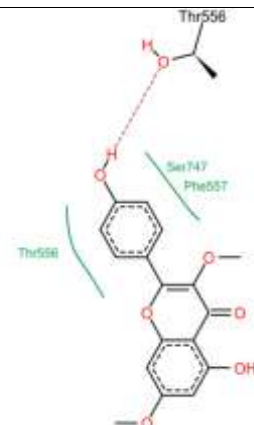
2
0 Изоориентин — —

2
1 Кампферид -25 0,27

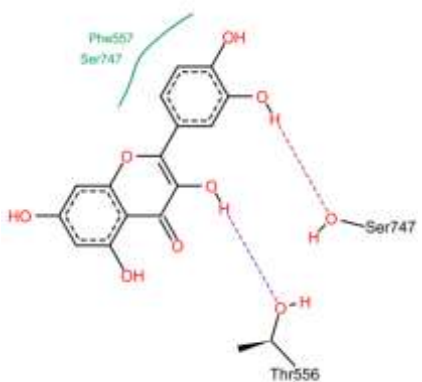
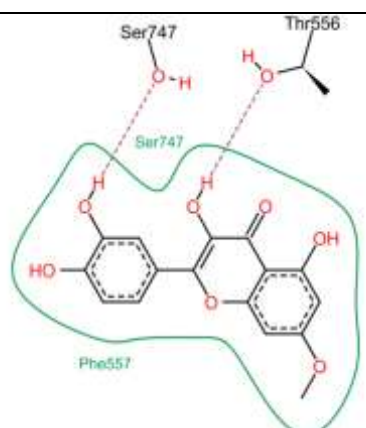
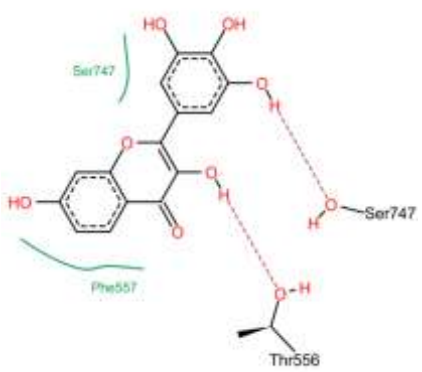


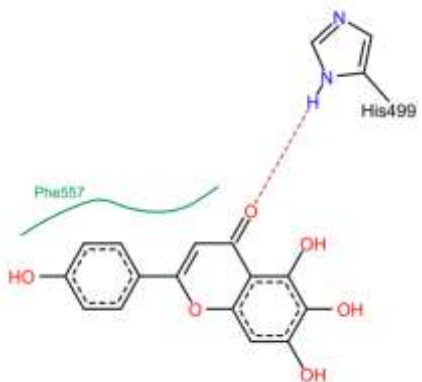
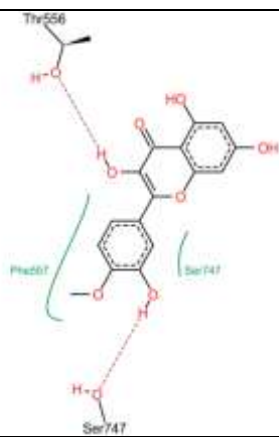
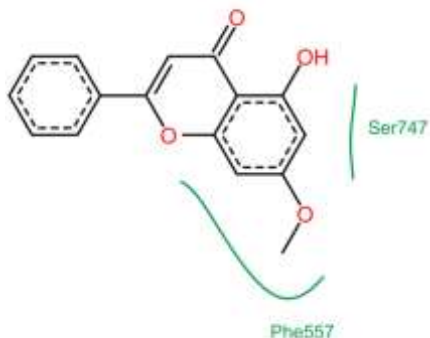
2
2 Кампферол — —

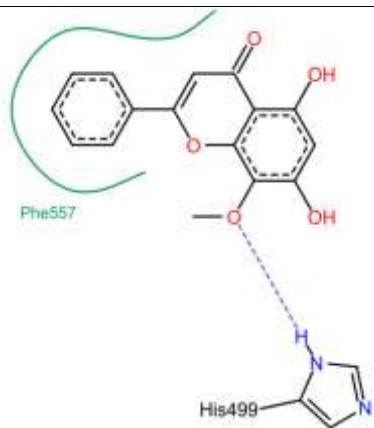
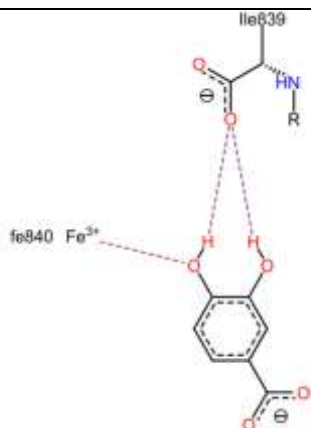
2
3 Куматакенин -10 0,1



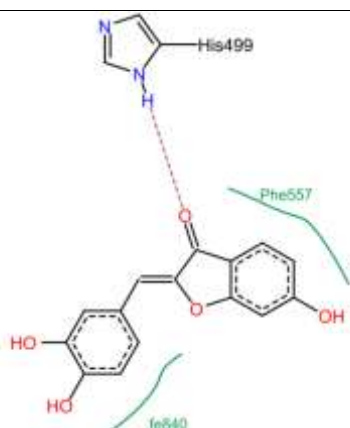
2 4	Лютеолин	-30	0,37	
2 5	Морин	—	—	—
2 6	Мирицетин	-10	0,1	
2 7	Мирицитрин	—	—	—
2 8	Норартокарпетин	—	—	—
2 9	Ориентин	—	—	—
3 0	Педалитин	-23	0,24	
3 1	Кверцетаген	—	—	—

3 2	Кверцетин	-17	0,16	
3 3	Кверцетрин	—	—	
3 4	Рамнетин	-14	0,15	
3 5	Робинетин	-11	0,12	
3 6	Робинин	—	—	—
3 7	Рутин	—	—	—

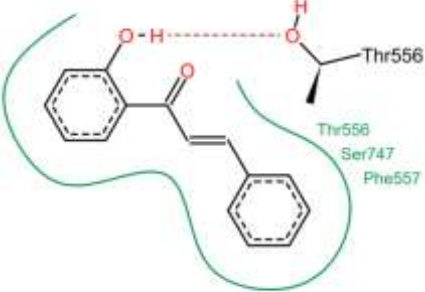
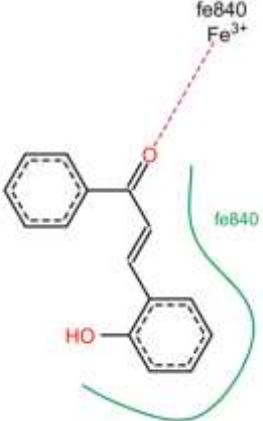
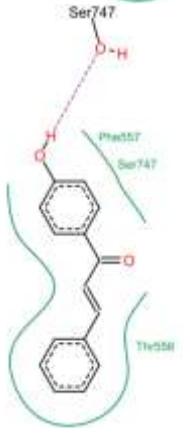
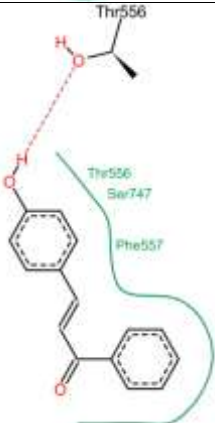
3 8	Скутеллареин	-5	0,06	
3 9	Сидеритифлавон	—	—	—
4 0	Силибин	—	—	—
4 1	Тамариксетин	-8	0,08	
4 2	Тангеретин	—	—	—
4 3	Тектохризин	-27	0,32	
4 4	Троксерутин	—	—	—
4 5	Виценин-2	—	—	—
4 6	Витексин	—	—	—

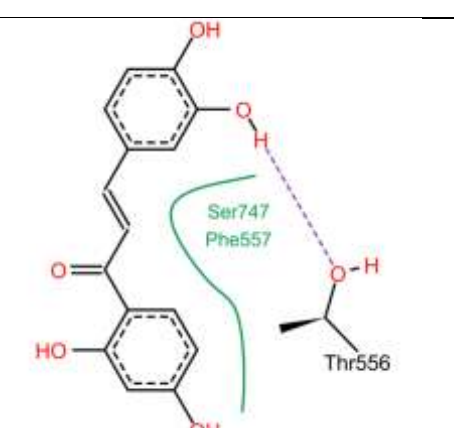
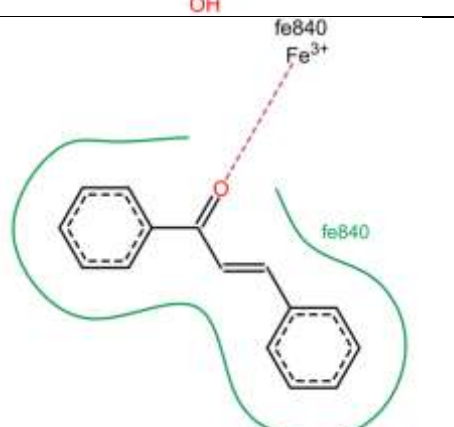
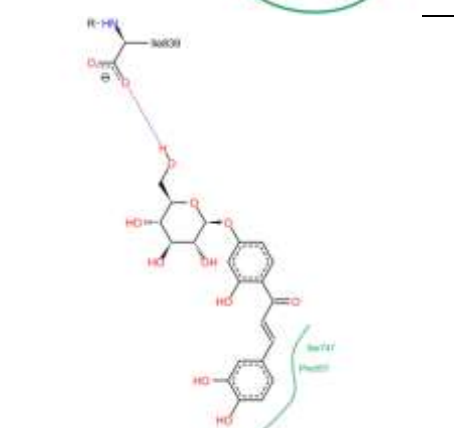
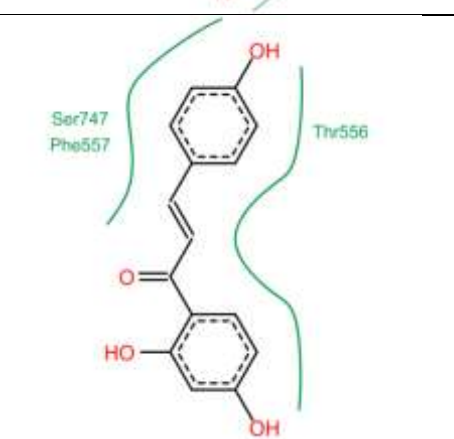
4 7	Вогонин	-15	0,17	
4 8	Вогонозид	—	—	—
4 9	Ксантомикрол	—	—	—
5 0	Протокатеховая кислота	-31	0,68	

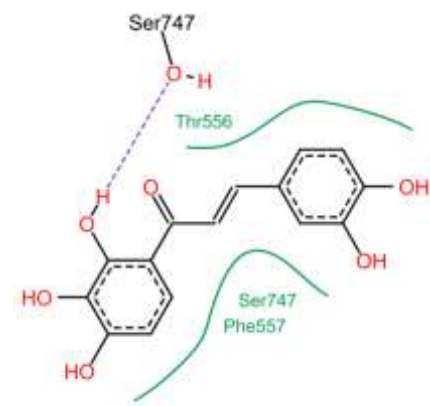
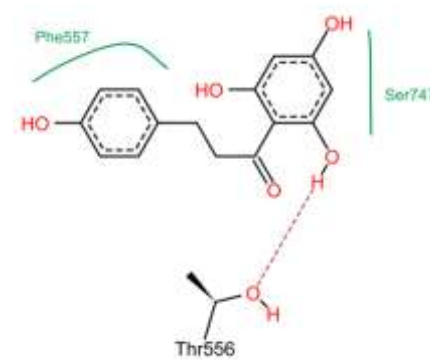
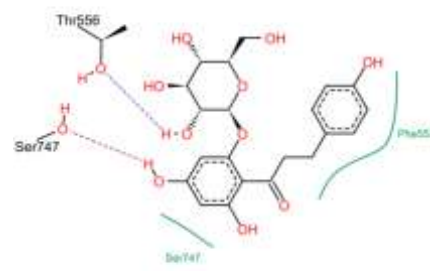
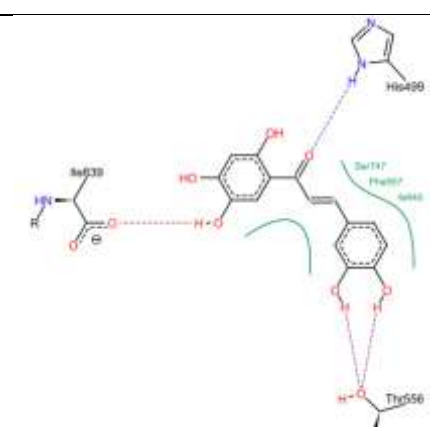
Ауроны

№	Лиганд	ΔG , кДж/моль	LE, ккал/моль	Предполагаемый механизм связывания
1	Ауреузидин	—	—	—
2	Маритиметин	—	—	—
3	Сульфуретин	-21	0,25	

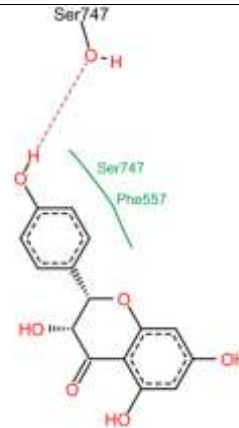
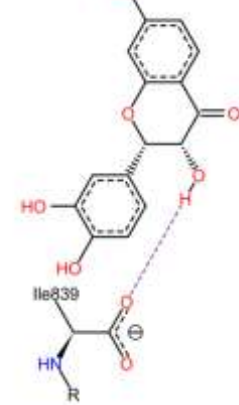
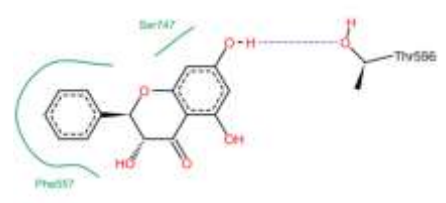
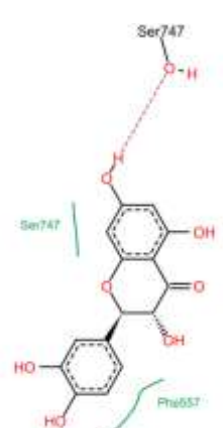
Халконы

№	Лиганд	ΔG , кДж/моль	LE, ккал/моль	Предполагаемый механизм связывания
1	2'-Гидроксихалкон	-29	0,41	
2	2-Гидроксихалкон	-32	0,44	
3	4'-Гидроксихалкон	-18	0,24	
4	4-Гидроксихалкон	-16	0,22	

5	Бутеин	-18	0,22	
6	Халкон	-33	0,49	
7	Кореопсин	-3	0,03	
8	Изоликвиритигенин	-13	0,16	

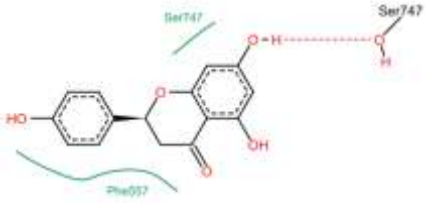
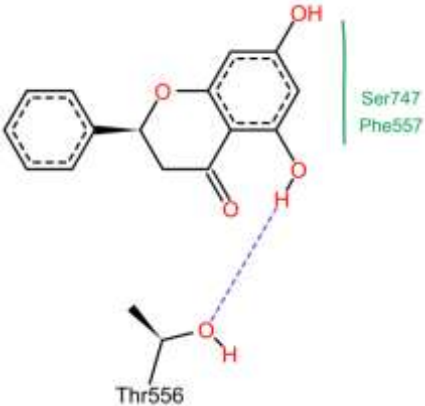
9	Оканин	-20	0,22	 <p>Chemical structure of Okanin (a stilbenoid) is shown. It features a central double bond with a 3,4,5-trihydroxyphenyl group on one side and a 3,4-dihydroxyphenyl group on the other. The structure is bound to a protein active site. Ser747 is shown forming a hydrogen bond with the hydroxyl group of the 3,4,5-trihydroxyphenyl ring. Thr556 and Phe557 are also indicated as interacting residues.</p>
1 0	Флоретин	-17	0,2	 <p>Chemical structure of Floretin (a stilbenoid) is shown. It features a central double bond with a 4-hydroxyphenyl group on one side and a 3,4,5-trihydroxyphenyl group on the other. The structure is bound to a protein active site. Phe557 and Ser747 are shown interacting with the 3,4,5-trihydroxyphenyl ring. Thr556 is shown interacting with the hydroxyl group of the 3,4,5-trihydroxyphenyl ring.</p>
1 1	Флоридзин	-17	0,13	 <p>Chemical structure of Flordizin (a stilbenoid) is shown. It features a central double bond with a 3,4,5-trihydroxyphenyl group on one side and a 3,4,5-trihydroxyphenyl group on the other. The structure is bound to a protein active site. Thr556 and Ser747 are shown interacting with the hydroxyl groups of the 3,4,5-trihydroxyphenyl rings. Phe557 is also indicated as an interacting residue.</p>
1 2	Стиллопсин	-25	0,28	 <p>Chemical structure of Stillopycin (a stilbenoid) is shown. It features a central double bond with a 3,4,5-trihydroxyphenyl group on one side and a 3,4,5-trihydroxyphenyl group on the other. The structure is bound to a protein active site. Ser633, Ser747, Phe557, Thr556, and His499 are shown interacting with the stilbenoid structure.</p>

Дигидрофлавоны

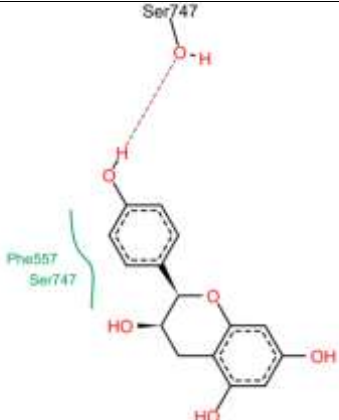
№	Лиганд	ΔG , кДж/моль	LE, ккал/моль	Предполагаемый механизм связывания
1	Аромадендрин	-7	0,08	
2	Фустин	-24	0,28	
3	Пинобаксин	-16	0,19	
4	Таксифолин	-12	0,13	

Флаваноны

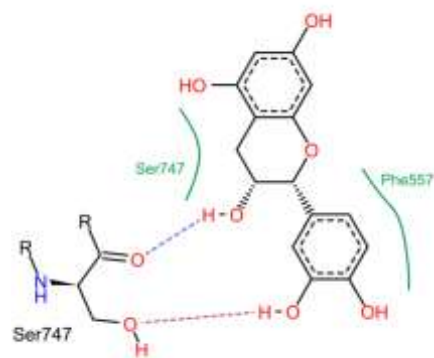
№	Лиганд	ΔG , кДж/моль	LE, ккал/моль	Предполагаемый механизм связывания
1	Эриодиктиол	-14	0,16	
2	Гесперидин	—	—	—
3	Гесперитин	-11	0,12	
4	Ликвиритигенин	-24	0,3	
5	Ликвиритин	—	—	—

6	Нарингенин	-7	0,08	
7	Нарингин	—	—	—
8	Пиноцембрин	-24	0,3	
9	Прунин	—	—	—
10	Салипурпозид	—	—	—

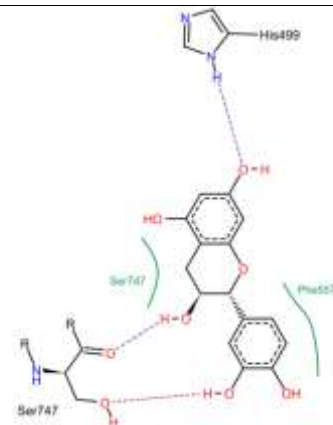
Флаваны

№	Лиганд	ΔG , кДж/моль	LE, ккал/моль	Предполагаемый механизм связывания
1	(-)-Эпиафцелехин	-9	0,11	

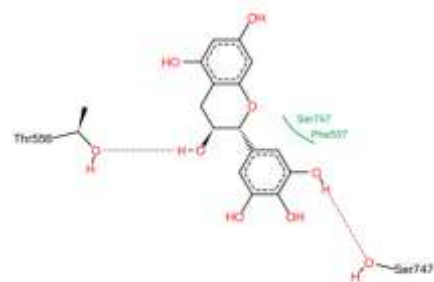
2 (-)-Эпикатехин -17 0,19



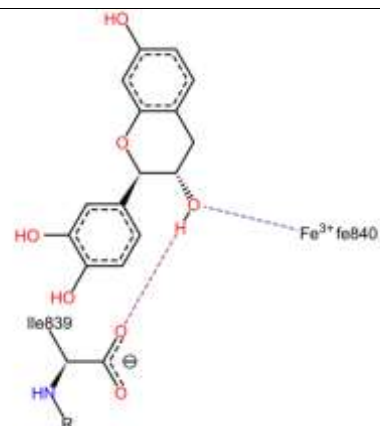
3 (+)-Катехин -19 0,22



4 (+)-Галлокатехин -12 0,13



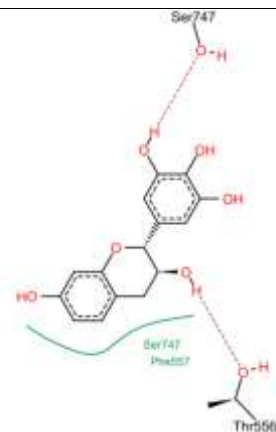
5 Физетинидол -31 0,37



6 Робинетинидол

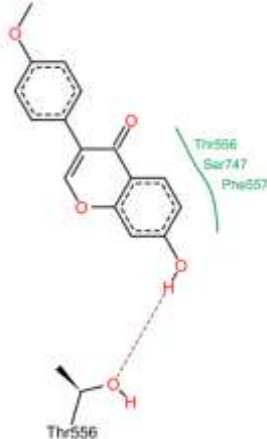
-17

0,2



Изофлавоны

№	Лиганд	ΔG , кДж/моль	LE, ккал/моль	Предполагаемый механизм связывания
1	Биоханин А	-15	0,17	
2	Даидзеин	-19	0,24	

3	Формонетин	-15	0,18	
4	Генистеин	—	—	—

Приложение Е. Параметры нейронной сети, «обученной» для прогнозирования активности ингибиторов липоксигеназы-1 сои (справочное)

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8" ?>
<PMML version="3.0">
<Header copyright="Copyright (c) StatSoft, Inc. All Rights Reserved.">
<Applicationname="STATISTICA Automated Neural Networks (SANN)" version="2.0" />
  </Header>
<DataDictionary numberOfFields="14">
  <DataFieldname="dG" optype="continuous" />
  <DataFieldname="Дв.св. 2-3" optype="continuous" />
  <DataField name="Класс" optype="categorical">
    <Valuevalue="Антоксантины" />
    <Valuevalue="Дигидрофлавонолы" />
    <Valuevalue="Флаваноны" />
    <Valuevalue="Флаваны" />
  </DataField>
  <DataField name="R3" optype="categorical">
    <Valuevalue="H" />
    <Valuevalue="O-CH3" />
    <Valuevalue="O-GAL-RAMN" />
    <Valuevalue="O-RAMN" />
    <Valuevalue="O-RUT" />
    <Valuevalue="OH" />
  </DataField>
  <DataField name="R4" optype="categorical">
    <Valuevalue="H" />
    <Valuevalue="O" />
  </DataField>
  <DataField name="R5" optype="categorical">
    <Valuevalue="H" />
    <Valuevalue="O-CH3" />
    <Valuevalue="O-GLUC" />
  </DataField>
</DataDictionary>
</PMML>
```

```

<Valuevalue="OH" />
  </DataField>
<-DataField name="R6" optype="categorical">
  <Valuevalue="GLUC" />
  <Valuevalue="H" />
  <Valuevalue="O-CH3" />
  <Valuevalue="OH" />
  </DataField>
<-DataField name="R7" optype="categorical">
  <Valuevalue="H" />
  <Valuevalue="O-CH3" />
  <Valuevalue="O-ETOL" />
  <Valuevalue="O-GLUC" />
  <Valuevalue="O-RAMN" />
  <Valuevalue="O-RAMN-GLUC" />
  <Valuevalue="O-RUT" />
  <Valuevalue="OH" />
  </DataField>
<-DataField name="R8" optype="categorical">
  <Valuevalue="GLUC" />
  <Valuevalue="H" />
  <Valuevalue="O-CH3" />
  <Valuevalue="OH" />
  </DataField>
<-DataField name="R2" optype="categorical">
  <Valuevalue="H" />
  <Valuevalue="OH" />
  </DataField>
<-DataField name="R3" optype="categorical">
  <Valuevalue="H" />
  <Valuevalue="O-ETOL" />
  <Valuevalue="O-LIG" />
  <Valuevalue="OH" />
  </DataField>

```

```

<DataField name="R4" optype="categorical">
  <Valuevalue="H" />
  <Valuevalue="O-CH3" />
  <Valuevalue="O-ETOL" />
  <Valuevalue="O-GLUC" />
  <Valuevalue="O-LIG" />
  <Valuevalue="OH" />
  </DataField>
<DataField name="R5" optype="categorical">
  <Valuevalue="H" />
  <Valuevalue="O-CH3" />
  <Valuevalue="OH" />
  </DataField>
<DataField name="R6" optype="categorical">
  <Valuevalue="H" />
  <Valuevalue="OH" />
  </DataField>
</DataDictionary>
<NeuralNetwork modelName="Лист1 in Отр_MLP 50-20-1" functionName="regression">
<MiningSchema>
  <MiningFieldname="dG" usageType="predicted" />
  <MiningFieldname="Дв.св. 2-3" lowValue="0.000000" highValue="1.000000" />
  <MiningFieldname="Класс" />
  <MiningFieldname="R3" />
  <MiningFieldname="R4" />
  <MiningFieldname="R5" />
  <MiningFieldname="R6" />
  <MiningFieldname="R7" />
  <MiningFieldname="R8" />
  <MiningFieldname="R2" />
  <MiningFieldname="R3" />
  <MiningFieldname="R4" />
  <MiningFieldname="R5" />
  <MiningFieldname="R6" />

```

```

    </MiningSchema>
  <-<NeuralInputs numberOfInputs="50">
  <-<NeuralInput id="0">
  <-<DerivedField>
  <-<NormContinuous field="Дв.св. 2-3" shift="-0,000000000000000e+000" scale="1,000000000000000e+000">
  <LinearNormorig="0.000000000000000e+000" norm="0.000000" />
  <LinearNormorig="1.000000000000000e+000" norm="1.000000" />
    </NormContinuous>
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="1">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="Класс" value="Антоксантины" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="2">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="Класс" value="Дигидрофлавонолы" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="3">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="Класс" value="Флаваноны" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="4">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="Класс" value="Флаваны" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="5">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R3" value="H" />
  </DerivedField>

```

```

    </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="6">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R3" value="O-CH3" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="7">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R3" value="O-GAL-RAMN" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="8">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R3" value="O-RAMN" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="9">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R3" value="O-RUT" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="10">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R3" value="OH" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="11">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R4" value="H" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="12">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R4" value="O" />

```

```

    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="13">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R5" value="H" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="14">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R5" value="O-CH3" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="15">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R5" value="O-GLUC" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="16">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R5" value="OH" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="17">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R6" value="GLUC" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="18">
  :-<DerivedField>
    <NormDiscretefield="R6" value="H" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  :-<NeuralInput id="19">
  :-<DerivedField>

```

```

<NormDiscretefield="R6" value="O-CH3" />
  </DerivedField>
</NeuralInput>
-:<NeuralInput id="20">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R6" value="OH" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="21">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R7" value="H" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="22">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R7" value="O-CH3" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="23">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R7" value="O-ETOL" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="24">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R7" value="O-GLUC" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="25">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R7" value="O-RAMN" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="26">

```



```

<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R7" value="O-RAMN-GLUC" />
  </DerivedField>
</NeuralInput>
<NeuralInput id="27">
  <DerivedField>
    <NormDiscretefield="R7" value="O-RUT" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
<NeuralInput id="28">
  <DerivedField>
    <NormDiscretefield="R7" value="OH" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
<NeuralInput id="29">
  <DerivedField>
    <NormDiscretefield="R8" value="GLUC" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
<NeuralInput id="30">
  <DerivedField>
    <NormDiscretefield="R8" value="H" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
<NeuralInput id="31">
  <DerivedField>
    <NormDiscretefield="R8" value="O-CH3" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
<NeuralInput id="32">
  <DerivedField>
    <NormDiscretefield="R8" value="OH" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>

```

```

-:<NeuralInput id="33">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R2" value="H" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="34">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R2" value="OH" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="35">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R3" value="H" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="36">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R3" value="O-ETOL" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="37">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R3" value="O-LIG" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="38">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R3" value="OH" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
-:<NeuralInput id="39">
-:<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R4" value="H" />
  </DerivedField>

```

```

    </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="40">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R4" value="O-CH3" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="41">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R4" value="O-ETOL" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="42">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R4" value="O-GLUC" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="43">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R4" value="O-LIG" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="44">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R4" value="OH" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="45">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R5" value="H" />
  </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <-<NeuralInput id="46">
  <-<DerivedField>
  <NormDiscretefield="R5" value="O-CH3" />

```

```

    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <NeuralInput id="47">
    <DerivedField>
      <NormDiscretefield="R5" value="OH" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <NeuralInput id="48">
    <DerivedField>
      <NormDiscretefield="R6" value="H" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
  <NeuralInput id="49">
    <DerivedField>
      <NormDiscretefield="R6" value="OH" />
    </DerivedField>
  </NeuralInput>
</NeuralInputs>
<NeuralLayer numberOfNeurons="20" activationFunction="tanh">
  <Neuron id="50" bias="1.34067101467633e-001">
    <Confrom="0" weight="8.21670291057223e-004" />
    <Confrom="1" weight="5.13673689768495e-003" />
    <Confrom="2" weight="-1.23369380394083e-001" />
    <Confrom="3" weight="4.41521904050923e-001" />
    <Confrom="4" weight="-1.78314630935271e-001" />
    <Confrom="5" weight="-2.19262914732054e-001" />
    <Confrom="6" weight="-2.11033542579265e-002" />
    <Confrom="7" weight="9.76783619166178e-002" />
    <Confrom="8" weight="2.20276239725433e-001" />
    <Confrom="9" weight="2.81621101660317e-001" />
    <Confrom="10" weight="-2.72236469942848e-001" />
    <Confrom="11" weight="-1.49175250128269e-001" />
    <Confrom="12" weight="2.83756961206920e-001" />
    <Confrom="13" weight="-3.47316765588720e-001" />
  </Neuron>

```

<Confrom="14" weight="1.25075948619630e-001" />
<Confrom="15" weight="3.87768157356667e-001" />
<Confrom="16" weight="-7.02553163066104e-002" />
<Confrom="17" weight="9.10533510757549e-002" />
<Confrom="18" weight="-1.06671904351085e-001" />
<Confrom="19" weight="1.54099473966624e-001" />
<Confrom="20" weight="-4.38264269243800e-002" />
<Confrom="21" weight="1.77576918945139e-001" />
<Confrom="22" weight="-4.51657746346527e-001" />
<Confrom="23" weight="1.35401043806836e-001" />
<Confrom="24" weight="1.59172533200967e-001" />
<Confrom="25" weight="1.22717020570270e-001" />
<Confrom="26" weight="2.91332264824886e-001" />
<Confrom="27" weight="1.63294927927012e-001" />
<Confrom="28" weight="-4.93697679937982e-001" />
<Confrom="29" weight="3.85612776715408e-001" />
<Confrom="30" weight="-3.65919051206314e-001" />
<Confrom="31" weight="3.00216141790082e-001" />
<Confrom="32" weight="-1.86071741323574e-001" />
<Confrom="33" weight="-1.20015658396371e-001" />
<Confrom="34" weight="2.61694237365180e-001" />
<Confrom="35" weight="-2.67187547274360e-002" />
<Confrom="36" weight="1.13115879491854e-001" />
<Confrom="37" weight="-2.93661797934017e-002" />
<Confrom="38" weight="4.51255071271625e-002" />
<Confrom="39" weight="-7.38221471892175e-001" />
<Confrom="40" weight="2.02177897759619e-001" />
<Confrom="41" weight="1.26684036472255e-001" />
<Confrom="42" weight="5.87960099004258e-001" />
<Confrom="43" weight="2.82061069433515e-002" />
<Confrom="44" weight="-3.28149605813011e-002" />
<Confrom="45" weight="1.53545206678663e-001" />
<Confrom="46" weight="1.15380586114882e-001" />
<Confrom="47" weight="-1.68776514658311e-001" />

<Confrom="48" weight="8.39355870619169e-002" />
<Confrom="49" weight="3.08929856374797e-002" />
</Neuron>
=Neuron id="51" bias="1.50274362480307e-001">
<Confrom="0" weight="1.12575343023636e-001" />
<Confrom="1" weight="9.95668571604373e-002" />
<Confrom="2" weight="-2.69274755254750e-001" />
<Confrom="3" weight="6.58514307204470e-001" />
<Confrom="4" weight="-3.21754816432213e-001" />
<Confrom="5" weight="2.89512180526666e-001" />
<Confrom="6" weight="-1.81263861771872e-002" />
<Confrom="7" weight="1.81829625452163e-001" />
<Confrom="8" weight="2.59398677485406e-001" />
<Confrom="9" weight="3.74015015945075e-001" />
<Confrom="10" weight="-9.40973700682995e-001" />
<Confrom="11" weight="-3.20076478352398e-001" />
<Confrom="12" weight="4.59287006888220e-001" />
<Confrom="13" weight="-7.35580951924494e-001" />
<Confrom="14" weight="1.76092718127661e-001" />
<Confrom="15" weight="4.11569404644858e-001" />
<Confrom="16" weight="3.20286899020956e-001" />
<Confrom="17" weight="1.80207619770466e-001" />
<Confrom="18" weight="2.53947802089485e-001" />
<Confrom="19" weight="9.75007336356639e-001" />
<Confrom="20" weight="-1.21337615738722e+000" />
<Confrom="21" weight="-1.26036921064928e-001" />
<Confrom="22" weight="7.48475323359729e-002" />
<Confrom="23" weight="1.82851223363193e-001" />
<Confrom="24" weight="-1.90040514861141e-001" />
<Confrom="25" weight="1.75548287068732e-001" />
<Confrom="26" weight="3.43916185668447e-001" />
<Confrom="27" weight="1.76941707512578e-001" />
<Confrom="28" weight="-4.90997652881608e-001" />
<Confrom="29" weight="5.05620386381385e-001" />

<Confrom="30" weight="-7.38211364025958e-001" />
<Confrom="31" weight="2.48891325905599e-001" />
<Confrom="32" weight="1.48445558940799e-001" />
<Confrom="33" weight="-1.04901458854322e-001" />
<Confrom="34" weight="2.72865444283382e-001" />
<Confrom="35" weight="2.09363798434706e-001" />
<Confrom="36" weight="1.83124961011233e-001" />
<Confrom="37" weight="3.02309011370436e-002" />
<Confrom="38" weight="-2.48852741266805e-001" />
<Confrom="39" weight="-1.27223731708989e+000" />
<Confrom="40" weight="2.72470157008509e-001" />
<Confrom="41" weight="1.62594413946270e-001" />
<Confrom="42" weight="5.41254168971402e-001" />
<Confrom="43" weight="2.76220104701772e-003" />
<Confrom="44" weight="3.95629861769008e-001" />
<Confrom="45" weight="1.17494600463799e+000" />
<Confrom="46" weight="1.73263732615579e-001" />
<Confrom="47" weight="-1.20670228425820e+000" />
<Confrom="48" weight="1.90618827751801e-001" />
<Confrom="49" weight="-7.10724588772913e-002" />

</Neuron>

<Neuron id="52" bias="1.96028331898485e-001">
<Confrom="0" weight="3.44811420090795e-001" />
<Confrom="1" weight="3.48298616089181e-001" />
<Confrom="2" weight="-1.93829956383026e-001" />
<Confrom="3" weight="3.80370909341649e-001" />
<Confrom="4" weight="-3.44880284272139e-001" />
<Confrom="5" weight="4.57308593693388e-001" />
<Confrom="6" weight="2.04549377065399e-002" />
<Confrom="7" weight="1.11719881119531e-001" />
<Confrom="8" weight="2.58547270291361e-002" />
<Confrom="9" weight="1.79042842067652e-001" />
<Confrom="10" weight="-5.97816808079513e-001" />
<Confrom="11" weight="-3.49423528420438e-001" />

<Confrom="12" weight="5.33265119432266e-001" />
<Confrom="13" weight="-4.31205288310639e-001" />
<Confrom="14" weight="1.43712781316839e-001" />
<Confrom="15" weight="-5.30121230205079e-002" />
<Confrom="16" weight="5.13657450499926e-001" />
<Confrom="17" weight="1.08061045748361e-001" />
<Confrom="18" weight="6.91510350698278e-001" />
<Confrom="19" weight="3.19843119481917e-001" />
<Confrom="20" weight="-9.10358240191286e-001" />
<Confrom="21" weight="-8.89847551609953e-002" />
<Confrom="22" weight="-6.67350175558910e-002" />
<Confrom="23" weight="1.19361266389967e-001" />
<Confrom="24" weight="5.09476990859234e-001" />
<Confrom="25" weight="1.07708046742692e-001" />
<Confrom="26" weight="2.25254502412242e-001" />
<Confrom="27" weight="1.07198047584392e-001" />
<Confrom="28" weight="-6.94327083278686e-001" />
<Confrom="29" weight="3.09783125393613e-001" />
<Confrom="30" weight="-9.78184148107384e-001" />
<Confrom="31" weight="5.35890927279664e-001" />
<Confrom="32" weight="2.92305531487232e-001" />
<Confrom="33" weight="1.86805749811713e-001" />
<Confrom="34" weight="2.38758834265635e-002" />
<Confrom="35" weight="7.80461469666759e-002" />
<Confrom="36" weight="9.73320947665899e-002" />
<Confrom="37" weight="-7.44417602935181e-003" />
<Confrom="38" weight="3.58626336437760e-003" />
<Confrom="39" weight="-6.71800272574766e-001" />
<Confrom="40" weight="8.76535463102314e-001" />
<Confrom="41" weight="1.34297645375157e-001" />
<Confrom="42" weight="-2.56109636922113e-001" />
<Confrom="43" weight="1.49632970048126e-002" />
<Confrom="44" weight="1.29935224348636e-001" />
<Confrom="45" weight="1.89173197030959e-001" />

<Confrom="46" weight="1.26658478860081e-001" />
<Confrom="47" weight="-1.17991527401941e-001" />
<Confrom="48" weight="2.81011033118767e-001" />
<Confrom="49" weight="-8.60626508178942e-002" />
</Neuron>
=<Neuron id="53" bias="2.71724759429261e-002">
<Confrom="0" weight="1.09931307533070e-002" />
<Confrom="1" weight="2.91209309433902e-002" />
<Confrom="2" weight="3.04715023361060e-003" />
<Confrom="3" weight="1.68490399916343e-001" />
<Confrom="4" weight="-1.65029068088865e-001" />
<Confrom="5" weight="4.17174483771570e-001" />
<Confrom="6" weight="2.81322653944485e-003" />
<Confrom="7" weight="1.17944324390329e-002" />
<Confrom="8" weight="-9.45366890298651e-002" />
<Confrom="9" weight="5.33155575374546e-003" />
<Confrom="10" weight="-2.83760998166887e-001" />
<Confrom="11" weight="-1.74896638048229e-001" />
<Confrom="12" weight="1.96763376538543e-001" />
<Confrom="13" weight="-1.88791096628843e-001" />
<Confrom="14" weight="6.32798680612716e-002" />
<Confrom="15" weight="-2.68169543597549e-001" />
<Confrom="16" weight="4.22954523132409e-001" />
<Confrom="17" weight="5.21863142953809e-002" />
<Confrom="18" weight="3.50925967954156e-001" />
<Confrom="19" weight="1.81529716878315e-001" />
<Confrom="20" weight="-5.10722299075099e-001" />
<Confrom="21" weight="-2.57335526693586e-001" />
<Confrom="22" weight="6.69865718539977e-002" />
<Confrom="23" weight="5.36525096726972e-002" />
<Confrom="24" weight="4.39330096673178e-001" />
<Confrom="25" weight="3.07511611401871e-002" />
<Confrom="26" weight="7.17614636115750e-002" />
<Confrom="27" weight="1.11054506852238e-002" />

<Confrom="28" weight="-3.71046031509612e-001" />
<Confrom="29" weight="1.06223193271128e-001" />
<Confrom="30" weight="-7.42411402777464e-001" />
<Confrom="31" weight="4.84335551257621e-001" />
<Confrom="32" weight="2.02405216722783e-001" />
<Confrom="33" weight="1.73293152195597e-001" />
<Confrom="34" weight="-1.37567849534690e-001" />
<Confrom="35" weight="1.04354453573925e-001" />
<Confrom="36" weight="5.04702131776240e-002" />
<Confrom="37" weight="-7.16711987916441e-003" />
<Confrom="38" weight="-9.54927014060012e-002" />
<Confrom="39" weight="-4.75986109143541e-001" />
<Confrom="40" weight="7.94488618978543e-001" />
<Confrom="41" weight="4.94176257449623e-002" />
<Confrom="42" weight="-5.49044478207830e-001" />
<Confrom="43" weight="2.11159394631765e-002" />
<Confrom="44" weight="1.88029481964188e-001" />
<Confrom="45" weight="1.35978339487566e-001" />
<Confrom="46" weight="8.22937452080244e-002" />
<Confrom="47" weight="-1.42144038734098e-001" />
<Confrom="48" weight="1.42857227914103e-001" />
<Confrom="49" weight="-1.04962327089645e-001" />

</Neuron>

┌<Neuron id="54" bias="1.54257983304564e-001">
<Confrom="0" weight="6.59147093610361e-002" />
<Confrom="1" weight="5.30875414973457e-002" />
<Confrom="2" weight="-1.27133722619308e-001" />
<Confrom="3" weight="4.11045125189303e-001" />
<Confrom="4" weight="-1.43030817460300e-001" />
<Confrom="5" weight="-3.77208211664885e-001" />
<Confrom="6" weight="6.30885896577827e-003" />
<Confrom="7" weight="9.76114957561457e-002" />
<Confrom="8" weight="2.04204340955851e-001" />
<Confrom="9" weight="2.63959103246879e-001" />

<Confrom="10" weight="4.89033215089385e-002" />
<Confrom="11" weight="-1.20294425134118e-001" />
<Confrom="12" weight="2.93310000090685e-001" />
<Confrom="13" weight="-3.29472605334565e-001" />
<Confrom="14" weight="1.20693272394281e-001" />
<Confrom="15" weight="3.53560595097726e-001" />
<Confrom="16" weight="4.93101190652519e-002" />
<Confrom="17" weight="8.48298107913969e-002" />
<Confrom="18" weight="-4.88216799171141e-001" />
<Confrom="19" weight="2.60300802140613e-001" />
<Confrom="20" weight="3.21878463635404e-001" />
<Confrom="21" weight="2.01607735611665e-001" />
<Confrom="22" weight="-3.82999073088395e-001" />
<Confrom="23" weight="7.71793244064362e-002" />
<Confrom="24" weight="8.92072156059706e-002" />
<Confrom="25" weight="9.25357293459583e-002" />
<Confrom="26" weight="2.80469195684968e-001" />
<Confrom="27" weight="1.81986051281046e-001" />
<Confrom="28" weight="-3.42472555533090e-001" />
<Confrom="29" weight="3.32704737695697e-001" />
<Confrom="30" weight="-1.26395291226367e-001" />
<Confrom="31" weight="2.80328656851391e-001" />
<Confrom="32" weight="-2.66159132619735e-001" />
<Confrom="33" weight="-4.16958593845107e-002" />
<Confrom="34" weight="2.26059192392382e-001" />
<Confrom="35" weight="9.95370731077012e-002" />
<Confrom="36" weight="8.67972520899212e-002" />
<Confrom="37" weight="4.72455901522997e-003" />
<Confrom="38" weight="-1.01947297482797e-002" />
<Confrom="39" weight="-7.69341478420302e-001" />
<Confrom="40" weight="1.58705345084718e-001" />
<Confrom="41" weight="8.04652195831497e-002" />
<Confrom="42" weight="5.43213745185161e-001" />
<Confrom="43" weight="-5.01727687394456e-003" />

<Confrom="44" weight="1.60651441025666e-001" />
<Confrom="45" weight="9.44891038431253e-002" />
<Confrom="46" weight="9.94589526602151e-002" />
<Confrom="47" weight="-3.41230175946965e-003" />
<Confrom="48" weight="1.15910755572997e-001" />
<Confrom="49" weight="3.76838603762888e-002" />
</Neuron>
<Neuron id="55" bias="1.23762293862259e-001">
<Confrom="0" weight="1.76138659142756e-001" />
<Confrom="1" weight="1.35944302256244e-001" />
<Confrom="2" weight="-2.19545377978290e-001" />
<Confrom="3" weight="4.92882134322902e-001" />
<Confrom="4" weight="-3.05237808152989e-001" />
<Confrom="5" weight="-7.22240046993535e-002" />
<Confrom="6" weight="-6.53517008085952e-003" />
<Confrom="7" weight="1.52856202607409e-001" />
<Confrom="8" weight="2.61126827408944e-001" />
<Confrom="9" weight="3.58677873093046e-001" />
<Confrom="10" weight="-5.85851169748984e-001" />
<Confrom="11" weight="-3.22422325204568e-001" />
<Confrom="12" weight="4.42574595489012e-001" />
<Confrom="13" weight="-5.15656932302629e-001" />
<Confrom="14" weight="1.42688927716641e-001" />
<Confrom="15" weight="3.78892978558756e-001" />
<Confrom="16" weight="1.25697483384585e-001" />
<Confrom="17" weight="1.55599778859036e-001" />
<Confrom="18" weight="2.64785321816310e-002" />
<Confrom="19" weight="6.01110310460278e-001" />
<Confrom="20" weight="-6.53190786029346e-001" />
<Confrom="21" weight="-3.78285061495320e-002" />
<Confrom="22" weight="-2.66457850916636e-002" />
<Confrom="23" weight="1.45528703986260e-001" />
<Confrom="24" weight="3.06949865774632e-001" />
<Confrom="25" weight="1.71097632011908e-001" />

<Confrom="26" weight="3.34775483690523e-001" />
<Confrom="27" weight="1.76421044433196e-001" />
<Confrom="28" weight="-9.38059682128783e-001" />
<Confrom="29" weight="4.58420398759038e-001" />
<Confrom="30" weight="-5.83978585516261e-001" />
<Confrom="31" weight="3.26818298684912e-001" />
<Confrom="32" weight="-1.34836627367105e-001" />
<Confrom="33" weight="-1.21222523880701e-001" />
<Confrom="34" weight="2.69342807736313e-001" />
<Confrom="35" weight="4.51919732581136e-002" />
<Confrom="36" weight="1.46660509925043e-001" />
<Confrom="37" weight="-3.49462213413285e-002" />
<Confrom="38" weight="-8.13422135089051e-002" />
<Confrom="39" weight="-1.20062780271472e+000" />
<Confrom="40" weight="2.98101128212717e-001" />
<Confrom="41" weight="1.69415622836761e-001" />
<Confrom="42" weight="4.51771461878204e-001" />
<Confrom="43" weight="4.58211454557254e-003" />
<Confrom="44" weight="3.96558482947693e-001" />
<Confrom="45" weight="6.06445620441044e-001" />
<Confrom="46" weight="1.44052414602266e-001" />
<Confrom="47" weight="-6.57559574649493e-001" />
<Confrom="48" weight="1.50900557110801e-001" />
<Confrom="49" weight="-1.07504390087633e-002" />

</Neuron>

┌<Neuron id="56" bias="2.14698439589352e-002">
<Confrom="0" weight="-7.38747404560449e-003" />
<Confrom="1" weight="-2.87139508512838e-002" />
<Confrom="2" weight="2.11125621107033e-001" />
<Confrom="3" weight="-4.42485204437887e-001" />
<Confrom="4" weight="2.80172741657683e-001" />
<Confrom="5" weight="2.85807551993656e-002" />
<Confrom="6" weight="-2.32273849884210e-002" />
<Confrom="7" weight="-1.28776422914573e-001" />

<Confrom="8" weight="-1.68956056680251e-001" />
<Confrom="9" weight="-2.76698646145602e-001" />
<Confrom="10" weight="5.48945506557648e-001" />
<Confrom="11" weight="2.37491983043297e-001" />
<Confrom="12" weight="-2.34608875444742e-001" />
<Confrom="13" weight="4.43427668487498e-001" />
<Confrom="14" weight="-1.10142333574747e-001" />
<Confrom="15" weight="-1.85032535930822e-001" />
<Confrom="16" weight="-8.58963206765521e-002" />
<Confrom="17" weight="-1.19064579613069e-001" />
<Confrom="18" weight="5.41606119351234e-002" />
<Confrom="19" weight="-3.15899276469633e-001" />
<Confrom="20" weight="4.04867822496943e-001" />
<Confrom="21" weight="1.30910634157945e-002" />
<Confrom="22" weight="1.36446341512325e-001" />
<Confrom="23" weight="-1.39667729301194e-001" />
<Confrom="24" weight="-1.88698209419194e-001" />
<Confrom="25" weight="-1.01322053131458e-001" />
<Confrom="26" weight="-2.53870747204610e-001" />
<Confrom="27" weight="-1.50785105882625e-001" />
<Confrom="28" weight="6.83096069889784e-001" />
<Confrom="29" weight="-3.71424359672709e-001" />
<Confrom="30" weight="6.58152177757588e-001" />
<Confrom="31" weight="-3.92623342901851e-001" />
<Confrom="32" weight="1.07744734785130e-001" />
<Confrom="33" weight="1.69193268441897e-001" />
<Confrom="34" weight="-1.80847823511871e-001" />
<Confrom="35" weight="1.47055472938055e-001" />
<Confrom="36" weight="-1.48669965567293e-001" />
<Confrom="37" weight="4.74793264319520e-003" />
<Confrom="38" weight="-2.01000740017177e-002" />
<Confrom="39" weight="9.25175302904481e-001" />
<Confrom="40" weight="-4.86575773446374e-001" />
<Confrom="41" weight="-1.08200838335113e-001" />

<Confrom="42" weight="-2.67657332354419e-001" />
<Confrom="43" weight="-1.94716641624128e-002" />
<Confrom="44" weight="-6.31221797695643e-002" />
<Confrom="45" weight="-3.35949771780818e-001" />
<Confrom="46" weight="-1.28541658662840e-001" />
<Confrom="47" weight="4.73659697432674e-001" />
<Confrom="48" weight="-1.19473683175403e-003" />
<Confrom="49" weight="2.13358790179856e-002" />
</Neuron>

<Neuron id="57" bias="1.34651795840462e-001">
<Confrom="0" weight="1.98372334082147e-002" />
<Confrom="1" weight="2.21950640186092e-002" />
<Confrom="2" weight="8.65868835357894e-002" />
<Confrom="3" weight="-2.92705724434318e-002" />
<Confrom="4" weight="1.15006915564227e-001" />
<Confrom="5" weight="-1.27408798840699e-001" />
<Confrom="6" weight="2.83075237648737e-004" />
<Confrom="7" weight="-2.09308095703968e-002" />
<Confrom="8" weight="7.99975415722625e-002" />
<Confrom="9" weight="6.09508600510553e-002" />
<Confrom="10" weight="1.59968761880504e-001" />
<Confrom="11" weight="8.83320774914167e-002" />
<Confrom="12" weight="7.43063573308817e-002" />
<Confrom="13" weight="2.56815282741141e-002" />
<Confrom="14" weight="-2.27554666731166e-002" />
<Confrom="15" weight="2.21813630522617e-001" />
<Confrom="16" weight="-8.69787292652390e-002" />
<Confrom="17" weight="-1.04376322320654e-004" />
<Confrom="18" weight="3.43207119444656e-001" />
<Confrom="19" weight="-2.52476586456100e-001" />
<Confrom="20" weight="6.11294987570956e-002" />
<Confrom="21" weight="1.81705560036678e-001" />
<Confrom="22" weight="-3.03722368983058e-001" />
<Confrom="23" weight="-9.84009047894142e-003" />

<Confrom="24" weight="9.48580496970585e-002" />
<Confrom="25" weight="2.25437728284275e-002" />
<Confrom="26" weight="8.62066008004870e-002" />
<Confrom="27" weight="5.23193542927491e-002" />
<Confrom="28" weight="2.88611018501209e-002" />
<Confrom="29" weight="-2.19964916165307e-002" />
<Confrom="30" weight="9.02628181217885e-002" />
<Confrom="31" weight="-1.68757147956209e-001" />
<Confrom="32" weight="2.00975338146382e-001" />
<Confrom="33" weight="5.79127560143038e-002" />
<Confrom="34" weight="7.90563994240171e-002" />
<Confrom="35" weight="7.78393282716914e-002" />
<Confrom="36" weight="-1.64397349318194e-002" />
<Confrom="37" weight="-1.74455400379509e-002" />
<Confrom="38" weight="6.72856809460679e-002" />
<Confrom="39" weight="3.26745574105949e-001" />
<Confrom="40" weight="-3.17488222538806e-001" />
<Confrom="41" weight="-4.46911594784159e-002" />
<Confrom="42" weight="3.58975569601801e-001" />
<Confrom="43" weight="-1.74416939237006e-004" />
<Confrom="44" weight="-1.93910012525103e-001" />
<Confrom="45" weight="-2.76395501362942e-001" />
<Confrom="46" weight="-1.54914399266729e-002" />
<Confrom="47" weight="4.21152523640843e-001" />
<Confrom="48" weight="8.09819720447444e-002" />
<Confrom="49" weight="4.36728553410170e-002" />
</Neuron>
=<Neuron id="58" bias="-2.08750879005796e-001">
<Confrom="0" weight="-1.04288112272832e-001" />
<Confrom="1" weight="-8.66750218726382e-002" />
<Confrom="2" weight="1.59981176456775e-001" />
<Confrom="3" weight="-3.71620687413499e-001" />
<Confrom="4" weight="1.37980269871939e-001" />
<Confrom="5" weight="2.89081170745649e-001" />

<Confrom="6" weight="1.41708297340391e-002" />
<Confrom="7" weight="-8.64587870637718e-002" />
<Confrom="8" weight="-2.18531617201378e-001" />
<Confrom="9" weight="-2.49564995082366e-001" />
<Confrom="10" weight="1.13767708080993e-001" />
<Confrom="11" weight="1.19329143999057e-001" />
<Confrom="12" weight="-3.30576919355664e-001" />
<Confrom="13" weight="3.08179649401167e-001" />
<Confrom="14" weight="-1.16741618051173e-001" />
<Confrom="15" weight="-3.76832687318396e-001" />
<Confrom="16" weight="-2.12233705209926e-002" />
<Confrom="17" weight="-1.00713557699458e-001" />
<Confrom="18" weight="3.33265092293844e-001" />
<Confrom="19" weight="-2.30436862837066e-001" />
<Confrom="20" weight="-2.1158969383205e-001" />
<Confrom="21" weight="-2.07663736517422e-001" />
<Confrom="22" weight="3.79643630374654e-001" />
<Confrom="23" weight="-9.05797677787805e-002" />
<Confrom="24" weight="-1.06234426295640e-001" />
<Confrom="25" weight="-1.21992789445547e-001" />
<Confrom="26" weight="-2.74242212736560e-001" />
<Confrom="27" weight="-1.90318983522933e-001" />
<Confrom="28" weight="3.89856851980248e-001" />
<Confrom="29" weight="-3.60993287462700e-001" />
<Confrom="30" weight="1.58900871329762e-001" />
<Confrom="31" weight="-2.15102104352465e-001" />
<Confrom="32" weight="1.95762493139364e-001" />
<Confrom="33" weight="3.32677837663047e-002" />
<Confrom="34" weight="-2.66293966067305e-001" />
<Confrom="35" weight="-9.97797576623959e-002" />
<Confrom="36" weight="-9.55611890283414e-002" />
<Confrom="37" weight="-1.80060421393851e-002" />
<Confrom="38" weight="3.19521340815491e-003" />
<Confrom="39" weight="7.09406791536192e-001" />

<Confrom="40" weight="-1.38621214896030e-001" />
<Confrom="41" weight="-9.19634381948057e-002" />
<Confrom="42" weight="-6.08672463571554e-001" />
<Confrom="43" weight="-4.64710720608835e-003" />
<Confrom="44" weight="-7.80621335790938e-002" />
<Confrom="45" weight="-1.27481139936901e-001" />
<Confrom="46" weight="-9.04788431900750e-002" />
<Confrom="47" weight="2.60528602576622e-002" />
<Confrom="48" weight="-1.48688302594099e-001" />
<Confrom="49" weight="-5.40367442000850e-002" />
</Neuron>

<Neuron id="59" bias="9.61934640317816e-002">
<Confrom="0" weight="4.23569316911371e-002" />
<Confrom="1" weight="1.58575079156938e-002" />
<Confrom="2" weight="-1.98831476011836e-001" />
<Confrom="3" weight="4.40542782814651e-001" />
<Confrom="4" weight="-2.24508489686396e-001" />
<Confrom="5" weight="-1.58374642659256e-001" />
<Confrom="6" weight="2.93812352484428e-002" />
<Confrom="7" weight="1.30338581224087e-001" />
<Confrom="8" weight="2.11732542969924e-001" />
<Confrom="9" weight="2.77828991512916e-001" />
<Confrom="10" weight="-4.31122623120638e-001" />
<Confrom="11" weight="-2.34474188725951e-001" />
<Confrom="12" weight="2.77637322098909e-001" />
<Confrom="13" weight="-4.05047223423828e-001" />
<Confrom="14" weight="1.23852732139699e-001" />
<Confrom="15" weight="3.11942434775730e-001" />
<Confrom="16" weight="4.28431693173710e-002" />
<Confrom="17" weight="9.89381083281042e-002" />
<Confrom="18" weight="-2.75843953601637e-003" />
<Confrom="19" weight="3.04820478279359e-001" />
<Confrom="20" weight="-3.41190879645704e-001" />
<Confrom="21" weight="5.20478351953514e-002" />

<Confrom="22" weight="-2.39179417213443e-001" />
 <Confrom="23" weight="1.37860161309642e-001" />
 <Confrom="24" weight="2.56164308129755e-001" />
 <Confrom="25" weight="1.11748502333178e-001" />
 <Confrom="26" weight="2.90204770114485e-001" />
 <Confrom="27" weight="1.76306804428335e-001" />
 <Confrom="28" weight="-6.47100777561528e-001" />
 <Confrom="29" weight="4.11153845328249e-001" />
 <Confrom="30" weight="-5.29399465228401e-001" />
 <Confrom="31" weight="3.59910187763632e-001" />
 <Confrom="32" weight="-1.47492757364764e-001" />
 <Confrom="33" weight="-1.53357565261352e-001" />
 <Confrom="34" weight="2.11524915550408e-001" />
 <Confrom="35" weight="-8.24023601388203e-002" />
 <Confrom="36" weight="1.13050970442412e-001" />
 <Confrom="37" weight="-2.04057211695696e-002" />
 <Confrom="38" weight="2.61356244547477e-002" />
 <Confrom="39" weight="-9.52622412399775e-001" />
 <Confrom="40" weight="3.05615478922064e-001" />
 <Confrom="41" weight="8.84503593609701e-002" />
 <Confrom="42" weight="4.36792695917614e-001" />
 <Confrom="43" weight="1.52324748782934e-002" />
 <Confrom="44" weight="1.53296208303161e-001" />
 <Confrom="45" weight="3.61899258700936e-001" />
 <Confrom="46" weight="1.32749365801282e-001" />
 <Confrom="47" weight="-3.80036096222109e-001" />
 <Confrom="48" weight="7.12586681359377e-002" />
 <Confrom="49" weight="3.09615442037393e-002" />
 </Neuron>
 <Neuron id="60" bias="2.73755119142708e-002">
 <Confrom="0" weight="3.12112739309109e-002" />
 <Confrom="1" weight="4.35670512946402e-002" />
 <Confrom="2" weight="-1.71223207263889e-001" />
 <Confrom="3" weight="3.28535102308548e-001" />

<Confrom="4" weight="-1.54407063055347e-001" />
<Confrom="5" weight="-9.52659509216903e-002" />
<Confrom="6" weight="2.09478554947911e-002" />
<Confrom="7" weight="8.90092649655755e-002" />
<Confrom="8" weight="1.29961832484588e-001" />
<Confrom="9" weight="1.99686949862005e-001" />
<Confrom="10" weight="-3.07117432547464e-001" />
<Confrom="11" weight="-1.51426543641359e-001" />
<Confrom="12" weight="1.77920271229775e-001" />
<Confrom="13" weight="-2.95769727750174e-001" />
<Confrom="14" weight="9.75185229453382e-002" />
<Confrom="15" weight="1.89099873829434e-001" />
<Confrom="16" weight="4.42799264106175e-002" />
<Confrom="17" weight="9.31503452722900e-002" />
<Confrom="18" weight="-1.27997710539681e-001" />
<Confrom="19" weight="2.66428279939890e-001" />
<Confrom="20" weight="-1.86605912933265e-001" />
<Confrom="21" weight="6.46760947567595e-002" />
<Confrom="22" weight="-1.58471786360336e-001" />
<Confrom="23" weight="9.01408464905629e-002" />
<Confrom="24" weight="1.12115641358147e-001" />
<Confrom="25" weight="8.23766892360094e-002" />
<Confrom="26" weight="1.98541424539857e-001" />
<Confrom="27" weight="1.05529593677550e-001" />
<Confrom="28" weight="-4.27824504719067e-001" />
<Confrom="29" weight="2.67300882313340e-001" />
<Confrom="30" weight="-3.91892050955329e-001" />
<Confrom="31" weight="2.59690856944501e-001" />
<Confrom="32" weight="-1.13070907626458e-001" />
<Confrom="33" weight="-1.22974063169396e-001" />
<Confrom="34" weight="1.68811154277948e-001" />
<Confrom="35" weight="-1.22210644108260e-001" />
<Confrom="36" weight="8.05568893716249e-002" />
<Confrom="37" weight="1.94396364829643e-002" />

<Confrom="38" weight="6.20090262210113e-002" />
<Confrom="39" weight="-6.69130783149145e-001" />
<Confrom="40" weight="3.01578266567922e-001" />
<Confrom="41" weight="7.04677971720785e-002" />
<Confrom="42" weight="2.71108244955793e-001" />
<Confrom="43" weight="-7.24646920552549e-003" />
<Confrom="44" weight="3.15426858472010e-002" />
<Confrom="45" weight="1.97477635389736e-001" />
<Confrom="46" weight="1.02943028158667e-001" />
<Confrom="47" weight="-2.62155617765083e-001" />
<Confrom="48" weight="1.27528797248831e-002" />
<Confrom="49" weight="2.04102506014439e-002" />
<Neuron>
-<Neuron id="61" bias="-1.24821931917222e-001">
<Confrom="0" weight="-1.77110732972365e-001" />
<Confrom="1" weight="-1.59718415717028e-001" />
<Confrom="2" weight="2.09916352627887e-001" />
<Confrom="3" weight="-4.83024181879205e-001" />
<Confrom="4" weight="3.05120527817745e-001" />
<Confrom="5" weight="1.13370660599593e-002" />
<Confrom="6" weight="-1.38029829464776e-003" />
<Confrom="7" weight="-1.67448283822057e-001" />
<Confrom="8" weight="-2.68552695095524e-001" />
<Confrom="9" weight="-3.49809913400217e-001" />
<Confrom="10" weight="6.38767898460300e-001" />
<Confrom="11" weight="3.07626392608170e-001" />
<Confrom="12" weight="-4.31496034474222e-001" />
<Confrom="13" weight="5.02252711160235e-001" />
<Confrom="14" weight="-1.48896606973494e-001" />
<Confrom="15" weight="-3.55470576931776e-001" />
<Confrom="16" weight="-1.03594787858983e-001" />
<Confrom="17" weight="-1.50770829430604e-001" />
<Confrom="18" weight="-3.34735507001012e-002" />
<Confrom="19" weight="-6.61272826973267e-001" />

<Confrom="20" weight="7.00556230921820e-001" />
<Confrom="21" weight="4.05367269896032e-002" />
<Confrom="22" weight="-6.42696514562378e-002" />
<Confrom="23" weight="-1.62007577218328e-001" />
<Confrom="24" weight="-2.76329278888935e-001" />
<Confrom="25" weight="-1.42947215476450e-001" />
<Confrom="26" weight="-3.47838887155072e-001" />
<Confrom="27" weight="-1.96690205151230e-001" />
<Confrom="28" weight="9.46385467718907e-001" />
<Confrom="29" weight="-4.58597037664320e-001" />
<Confrom="30" weight="5.00063288179116e-001" />
<Confrom="31" weight="-2.85535358930219e-001" />
<Confrom="32" weight="1.04735646369411e-001" />
<Confrom="33" weight="1.04790552925465e-001" />
<Confrom="34" weight="-2.54963588383991e-001" />
<Confrom="35" weight="-9.65503835259190e-002" />
<Confrom="36" weight="-1.13368238622955e-001" />
<Confrom="37" weight="-7.92357026966900e-003" />
<Confrom="38" weight="1.19419836440639e-001" />
<Confrom="39" weight="1.15350522172232e+000" />
<Confrom="40" weight="-2.71189913195621e-001" />
<Confrom="41" weight="-1.56087975586005e-001" />
<Confrom="42" weight="-4.92578048001774e-001" />
<Confrom="43" weight="-1.10655360949647e-002" />
<Confrom="44" weight="-3.77434174753181e-001" />
<Confrom="45" weight="-6.76697523447337e-001" />
<Confrom="46" weight="-1.53022630952260e-001" />
<Confrom="47" weight="7.35085615835283e-001" />
<Confrom="48" weight="-1.18270438328666e-001" />
<Confrom="49" weight="6.51472452512221e-003" />
</Neuron>
=<Neuron id="62" bias="-1.13689675782741e-001">
<Confrom="0" weight="3.34803859720555e-003" />
<Confrom="1" weight="3.58350080402343e-002" />

<Confrom="2" weight="-1.09702363458712e-001" />
<Confrom="3" weight="7.59712361975694e-002" />
<Confrom="4" weight="-1.07334757380062e-001" />
<Confrom="5" weight="1.73728707398186e-001" />
<Confrom="6" weight="3.01650057952669e-003" />
<Confrom="7" weight="2.22556866924123e-002" />
<Confrom="8" weight="-6.44107369851269e-002" />
<Confrom="9" weight="1.41436533805867e-002" />
<Confrom="10" weight="-2.29603110785338e-001" />
<Confrom="11" weight="-1.15581456056405e-001" />
<Confrom="12" weight="2.27629315107998e-002" />
<Confrom="13" weight="-7.18483438386892e-002" />
<Confrom="14" weight="1.77554358043587e-002" />
<Confrom="15" weight="-1.70201536232348e-001" />
<Confrom="16" weight="1.21678178932149e-001" />
<Confrom="17" weight="2.08993243614808e-002" />
<Confrom="18" weight="-3.17985082481408e-001" />
<Confrom="19" weight="3.04320168196560e-001" />
<Confrom="20" weight="-1.18738964002503e-001" />
<Confrom="21" weight="-1.81532692455127e-001" />
<Confrom="22" weight="2.46750039291112e-001" />
<Confrom="23" weight="1.45581866804844e-002" />
<Confrom="24" weight="-9.32362447310127e-002" />
<Confrom="25" weight="2.78694821995248e-002" />
<Confrom="26" weight="-1.70226019377683e-002" />
<Confrom="27" weight="-2.89273090504462e-002" />
<Confrom="28" weight="-7.54182691279439e-002" />
<Confrom="29" weight="2.33427613182200e-002" />
<Confrom="30" weight="-1.76297604863097e-001" />
<Confrom="31" weight="2.31856847645438e-001" />
<Confrom="32" weight="-1.80562406362124e-001" />
<Confrom="33" weight="-4.39571101021890e-002" />
<Confrom="34" weight="-6.68103254998134e-002" />
<Confrom="35" weight="-7.59175782868715e-002" />

<Confrom="36" weight="4.92424478783462e-002" />
<Confrom="37" weight="-1.60905145135081e-002" />
<Confrom="38" weight="-2.36771143601358e-002" />
<Confrom="39" weight="-4.05928434855592e-001" />
<Confrom="40" weight="4.32866743523276e-001" />
<Confrom="41" weight="3.01242231894130e-002" />
<Confrom="42" weight="-3.00107151300534e-001" />
<Confrom="43" weight="2.13663108264217e-002" />
<Confrom="44" weight="1.65144113705868e-001" />
<Confrom="45" weight="2.65095819663129e-001" />
<Confrom="46" weight="4.77414378782669e-002" />
<Confrom="47" weight="-3.98031141433985e-001" />
<Confrom="48" weight="-6.05504388048732e-002" />
<Confrom="49" weight="-4.20193273891946e-002" />
<Neuron>
-<Neuron id="63" bias="-2.45198290859508e-001">
<Confrom="0" weight="-8.31818293834402e-002" />
<Confrom="1" weight="-9.64374532662240e-002" />
<Confrom="2" weight="-1.58942907569145e-001" />
<Confrom="3" weight="8.68736012281532e-002" />
<Confrom="4" weight="-1.15567690006795e-001" />
<Confrom="5" weight="2.69623246148179e-001" />
<Confrom="6" weight="3.09377874897670e-003" />
<Confrom="7" weight="6.68325586686453e-003" />
<Confrom="8" weight="-1.44031075873656e-001" />
<Confrom="9" weight="-7.29565720396119e-002" />
<Confrom="10" weight="-3.03727047870453e-001" />
<Confrom="11" weight="-1.16348681527017e-001" />
<Confrom="12" weight="-1.32475241737652e-001" />
<Confrom="13" weight="1.65697780284856e-002" />
<Confrom="14" weight="-3.37797087881783e-002" />
<Confrom="15" weight="-3.37365333835154e-001" />
<Confrom="16" weight="5.33918032535533e-002" />
<Confrom="17" weight="-2.62144827088408e-002" />

<Confrom="18" weight="-5.80788535890200e-001" />
<Confrom="19" weight="1.64807154043121e-001" />
<Confrom="20" weight="2.11796396318584e-001" />
<Confrom="21" weight="-2.57006798613015e-001" />
<Confrom="22" weight="3.35231947789963e-001" />
<Confrom="23" weight="-3.74793453426847e-003" />
<Confrom="24" weight="-9.00819639504362e-002" />
<Confrom="25" weight="-4.11945370550240e-002" />
<Confrom="26" weight="-1.51045847944664e-001" />
<Confrom="27" weight="-1.22470695349749e-001" />
<Confrom="28" weight="2.84020545390769e-002" />
<Confrom="29" weight="-9.03528848464895e-002" />
<Confrom="30" weight="1.55164160529514e-001" />
<Confrom="31" weight="1.04699046751573e-002" />
<Confrom="32" weight="-3.12079907300378e-001" />
<Confrom="33" weight="-9.64140859222486e-002" />
<Confrom="34" weight="-1.14932826879589e-001" />
<Confrom="35" weight="-3.23208443638793e-001" />
<Confrom="36" weight="-2.39903079568578e-003" />
<Confrom="37" weight="9.84562521652729e-003" />
<Confrom="38" weight="9.77756159102503e-002" />
<Confrom="39" weight="-3.61766233803547e-001" />
<Confrom="40" weight="4.56040701683107e-001" />
<Confrom="41" weight="2.49818660583803e-002" />
<Confrom="42" weight="-4.87436053382723e-001" />
<Confrom="43" weight="-3.31446745659101e-005" />
<Confrom="44" weight="9.11779388248420e-002" />
<Confrom="45" weight="5.13378666813409e-001" />
<Confrom="46" weight="-4.47784375821426e-002" />
<Confrom="47" weight="-7.05248150639243e-001" />
<Confrom="48" weight="-1.83211608160932e-001" />
<Confrom="49" weight="-4.78883767877499e-002" />
</Neuron>
<Neuron id="64" bias="9.10149969382567e-002">

<Confrom="0" weight="1.74555694182830e-001" />
<Confrom="1" weight="1.97204459315700e-001" />
<Confrom="2" weight="-2.94518687969061e-001" />
<Confrom="3" weight="4.76588913696708e-001" />
<Confrom="4" weight="-2.85055938452981e-001" />
<Confrom="5" weight="3.45108251485418e-001" />
<Confrom="6" weight="9.79989917728748e-003" />
<Confrom="7" weight="1.17249277382925e-001" />
<Confrom="8" weight="1.17589389538287e-001" />
<Confrom="9" weight="2.36108821425103e-001" />
<Confrom="10" weight="-6.54527242140722e-001" />
<Confrom="11" weight="-2.46568717596524e-001" />
<Confrom="12" weight="3.81435417198931e-001" />
<Confrom="13" weight="-4.47576202580840e-001" />
<Confrom="14" weight="1.19961658186059e-001" />
<Confrom="15" weight="8.00466910315410e-002" />
<Confrom="16" weight="3.01810919336110e-001" />
<Confrom="17" weight="1.14497842396777e-001" />
<Confrom="18" weight="-1.46038314043251e-001" />
<Confrom="19" weight="3.90070161504096e-001" />
<Confrom="20" weight="-2.56543300339954e-001" />
<Confrom="21" weight="-1.13550143919683e-001" />
<Confrom="22" weight="-3.03411176429213e-002" />
<Confrom="23" weight="1.54604440911150e-001" />
<Confrom="24" weight="1.70052324644865e-001" />
<Confrom="25" weight="1.23383481102757e-001" />
<Confrom="26" weight="2.57755309816469e-001" />
<Confrom="27" weight="1.13876297129941e-001" />
<Confrom="28" weight="-6.05563234243194e-001" />
<Confrom="29" weight="3.61800246959607e-001" />
<Confrom="30" weight="-6.00466016195645e-001" />
<Confrom="31" weight="4.97765865898353e-001" />
<Confrom="32" weight="-1.68021798455165e-001" />
<Confrom="33" weight="1.14267809297567e-002" />

<Confrom="34" weight="7.75656638198409e-002" />
<Confrom="35" weight="-1.51450964603184e-001" />
<Confrom="36" weight="1.22375606427782e-001" />
<Confrom="37" weight="-3.06475569180299e-002" />
<Confrom="38" weight="1.04018293549373e-001" />
<Confrom="39" weight="-9.14205252984531e-001" />
<Confrom="40" weight="7.30739866456051e-001" />
<Confrom="41" weight="1.29997497759128e-001" />
<Confrom="42" weight="2.52867304803437e-002" />
<Confrom="43" weight="-1.70347635357329e-002" />
<Confrom="44" weight="1.09569626551632e-001" />
<Confrom="45" weight="4.72407590392907e-001" />
<Confrom="46" weight="1.44416404150798e-001" />
<Confrom="47" weight="-4.86849177814987e-001" />
<Confrom="48" weight="1.64543791564638e-001" />
<Confrom="49" weight="-6.62353978463302e-002" />
</Neuron>
-<Neuron id="65" bias="-2.43790429423952e-001">
<Confrom="0" weight="-6.69475605721571e-002" />
<Confrom="1" weight="-5.09036947354502e-002" />
<Confrom="2" weight="-3.07186265542241e-002" />
<Confrom="3" weight="-6.57686156456859e-002" />
<Confrom="4" weight="-9.13667754297100e-002" />
<Confrom="5" weight="1.13129737778579e-001" />
<Confrom="6" weight="5.68366470885318e-003" />
<Confrom="7" weight="1.65819589325299e-002" />
<Confrom="8" weight="-1.10860117909895e-001" />
<Confrom="9" weight="-4.52000850314664e-002" />
<Confrom="10" weight="-2.08684562130479e-001" />
<Confrom="11" weight="-8.34613439497056e-002" />
<Confrom="12" weight="-1.96884866142688e-001" />
<Confrom="13" weight="4.14244495973319e-002" />
<Confrom="14" weight="-5.29130015632888e-002" />
<Confrom="15" weight="-2.20923835403095e-001" />

<Confrom="16" weight="6.93841566360490e-003" />
<Confrom="17" weight="5.46115580944429e-003" />
<Confrom="18" weight="-4.73179679649968e-001" />
<Confrom="19" weight="1.99005463666410e-001" />
<Confrom="20" weight="1.75927776444810e-002" />
<Confrom="21" weight="-2.11040364495376e-001" />
<Confrom="22" weight="3.49319112114515e-001" />
<Confrom="23" weight="1.26160032297009e-002" />
<Confrom="24" weight="-2.15686174719227e-002" />
<Confrom="25" weight="-1.01613733497677e-002" />
<Confrom="26" weight="-1.45456003940815e-001" />
<Confrom="27" weight="-8.05123976355413e-002" />
<Confrom="28" weight="-1.28537387535954e-001" />
<Confrom="29" weight="-6.00352803088972e-002" />
<Confrom="30" weight="4.01227963596102e-002" />
<Confrom="31" weight="2.74191401499637e-002" />
<Confrom="32" weight="-2.86029975471120e-001" />
<Confrom="33" weight="-1.59789420211981e-001" />
<Confrom="34" weight="-8.88330030257857e-002" />
<Confrom="35" weight="-1.06054563811050e-001" />
<Confrom="36" weight="-1.36798042077129e-002" />
<Confrom="37" weight="1.12581767932995e-003" />
<Confrom="38" weight="-1.21951893670505e-001" />
<Confrom="39" weight="-2.45230005816015e-001" />
<Confrom="40" weight="7.60771330174097e-002" />
<Confrom="41" weight="-1.31776579391158e-002" />
<Confrom="42" weight="-3.59777512017990e-001" />
<Confrom="43" weight="-4.82817280901138e-004" />
<Confrom="44" weight="3.00822055130461e-001" />
<Confrom="45" weight="3.13366471187848e-001" />
<Confrom="46" weight="-2.12293424766889e-002" />
<Confrom="47" weight="-5.17668585848550e-001" />
<Confrom="48" weight="-1.97551906805756e-001" />
<Confrom="49" weight="-3.92718436585559e-002" />

</Neuron>

```
≡<Neuron id="66" bias="1.77487552292579e-001">  
<Confrom="0" weight="1.59312127061640e-001" />  
<Confrom="1" weight="1.70139733976303e-001" />  
<Confrom="2" weight="-2.19783721646508e-001" />  
<Confrom="3" weight="2.21412811570980e-001" />  
<Confrom="4" weight="-1.58938932136001e-002" />  
<Confrom="5" weight="-2.59484037555677e-001" />  
<Confrom="6" weight="5.14972707772595e-003" />  
<Confrom="7" weight="9.31068685183109e-002" />  
<Confrom="8" weight="1.91008377684041e-001" />  
<Confrom="9" weight="2.49114654697116e-001" />  
<Confrom="10" weight="-8.61870968564492e-002" />  
<Confrom="11" weight="8.99347489024073e-003" />  
<Confrom="12" weight="1.49171661913608e-001" />  
<Confrom="13" weight="-4.71204706216946e-001" />  
<Confrom="14" weight="1.11698112345248e-001" />  
<Confrom="15" weight="3.48473940228293e-001" />  
<Confrom="16" weight="1.26781177333237e-001" />  
<Confrom="17" weight="8.48087654916449e-002" />  
<Confrom="18" weight="-4.80988633751947e-001" />  
<Confrom="19" weight="2.16457982675093e-001" />  
<Confrom="20" weight="3.42696749331139e-001" />  
<Confrom="21" weight="2.94933195811856e-001" />  
<Confrom="22" weight="-2.63275368809209e-001" />  
<Confrom="23" weight="6.89757014795662e-002" />  
<Confrom="24" weight="-6.85675688717345e-004" />  
<Confrom="25" weight="8.31511365199928e-002" />  
<Confrom="26" weight="2.42342642489808e-001" />  
<Confrom="27" weight="1.10955985553999e-001" />  
<Confrom="28" weight="-3.94256795302485e-001" />  
<Confrom="29" weight="2.93283172004659e-001" />  
<Confrom="30" weight="-8.04335810547079e-002" />  
<Confrom="31" weight="9.89246324129283e-002" />
```

<Confrom="32" weight="-1.47307261319743e-001" />
 <Confrom="33" weight="-6.02644686284842e-002" />
 <Confrom="34" weight="2.17134444173648e-001" />
 <Confrom="35" weight="-8.86844010179502e-002" />
 <Confrom="36" weight="6.69100450347368e-002" />
 <Confrom="37" weight="-1.80785713108755e-002" />
 <Confrom="38" weight="1.78843366371163e-001" />
 <Confrom="39" weight="-3.82630681958964e-001" />
 <Confrom="40" weight="7.04524369902151e-002" />
 <Confrom="41" weight="6.72787472761564e-002" />
 <Confrom="42" weight="6.18011039100918e-001" />
 <Confrom="43" weight="-6.22613917137737e-003" />
 <Confrom="44" weight="-2.08267046609900e-001" />
 <Confrom="45" weight="4.77629551084450e-002" />
 <Confrom="46" weight="8.64708068299035e-002" />
 <Confrom="47" weight="1.09113719028429e-002" />
 <Confrom="48" weight="8.05875246985050e-002" />
 <Confrom="49" weight="6.51987267678379e-002" />
 </Neuron>
 <Neuron id="67" bias="-2.01500672792891e-002">
 <Confrom="0" weight="3.15355148394652e-002" />
 <Confrom="1" weight="9.55499869606894e-003" />
 <Confrom="2" weight="1.41335031515498e-001" />
 <Confrom="3" weight="-3.79790098259340e-001" />
 <Confrom="4" weight="1.69713131446943e-001" />
 <Confrom="5" weight="1.07038574687336e-001" />
 <Confrom="6" weight="-4.16661350887725e-003" />
 <Confrom="7" weight="-9.02327294940412e-002" />
 <Confrom="8" weight="-1.75586664755611e-001" />
 <Confrom="9" weight="-2.57153606257640e-001" />
 <Confrom="10" weight="4.22672703768410e-001" />
 <Confrom="11" weight="1.86372998976353e-001" />
 <Confrom="12" weight="-1.96091614532245e-001" />
 <Confrom="13" weight="3.32216136386155e-001" />

<Confrom="14" weight="-1.11144072748743e-001" />
<Confrom="15" weight="-2.79171692511524e-001" />
<Confrom="16" weight="2.48396352085892e-002" />
<Confrom="17" weight="-7.31615747876168e-002" />
<Confrom="18" weight="3.65591042217933e-003" />
<Confrom="19" weight="-1.62917464810765e-001" />
<Confrom="20" weight="2.25467052099975e-001" />
<Confrom="21" weight="-8.62519610402325e-002" />
<Confrom="22" weight="2.65181614549988e-001" />
<Confrom="23" weight="-1.02977659982602e-001" />
<Confrom="24" weight="-1.61893051568767e-001" />
<Confrom="25" weight="-1.26717210636558e-001" />
<Confrom="26" weight="-2.36031790905153e-001" />
<Confrom="27" weight="-1.33424162493966e-001" />
<Confrom="28" weight="5.43467489070012e-001" />
<Confrom="29" weight="-3.38524477106801e-001" />
<Confrom="30" weight="4.98085669591316e-001" />
<Confrom="31" weight="-2.79735406502085e-001" />
<Confrom="32" weight="1.02879431856925e-001" />
<Confrom="33" weight="1.70927476516619e-001" />
<Confrom="34" weight="-1.57431884744688e-001" />
<Confrom="35" weight="1.02170499585042e-001" />
<Confrom="36" weight="-8.21678162356289e-002" />
<Confrom="37" weight="7.03912548368125e-005" />
<Confrom="38" weight="-4.98714804085570e-002" />
<Confrom="39" weight="6.90368350939404e-001" />
<Confrom="40" weight="-2.88511249587883e-001" />
<Confrom="41" weight="-1.16577145177681e-001" />
<Confrom="42" weight="-4.21929478911949e-001" />
<Confrom="43" weight="7.91821713942907e-003" />
<Confrom="44" weight="9.36588180786227e-002" />
<Confrom="45" weight="-2.14570269882222e-001" />
<Confrom="46" weight="-9.01277117503391e-002" />
<Confrom="47" weight="2.89619603380092e-001" />

<Confrom="48" weight="-1.08095341150170e-002" />
<Confrom="49" weight="-2.00689358109738e-002" />
</Neuron>
=<Neuron id="68" bias="4.52460780055771e-002">
<Confrom="0" weight="-1.29007975357481e-003" />
<Confrom="1" weight="-7.72665380146558e-003" />
<Confrom="2" weight="1.15394602686673e-001" />
<Confrom="3" weight="-1.80700303970868e-001" />
<Confrom="4" weight="1.12485074030790e-001" />
<Confrom="5" weight="-1.11478632324915e-001" />
<Confrom="6" weight="8.17962750090049e-003" />
<Confrom="7" weight="-6.93545475552226e-002" />
<Confrom="8" weight="1.44848745034511e-002" />
<Confrom="9" weight="-7.02386718286187e-002" />
<Confrom="10" weight="2.71937862388256e-001" />
<Confrom="11" weight="1.42517056941463e-001" />
<Confrom="12" weight="-9.71826459294725e-002" />
<Confrom="13" weight="1.61784545767737e-001" />
<Confrom="14" weight="-5.67904828706445e-002" />
<Confrom="15" weight="3.61115452219351e-002" />
<Confrom="16" weight="-1.12137650565383e-001" />
<Confrom="17" weight="-3.93558714989584e-002" />
<Confrom="18" weight="1.07870472740352e-001" />
<Confrom="19" weight="-1.98853540888322e-001" />
<Confrom="20" weight="1.89537993118847e-001" />
<Confrom="21" weight="4.54779051692909e-002" />
<Confrom="22" weight="-1.61169199130436e-002" />
<Confrom="23" weight="-2.77435156090348e-002" />
<Confrom="24" weight="-3.17060523987768e-002" />
<Confrom="25" weight="-7.23140122449658e-002" />
<Confrom="26" weight="-4.86180361691661e-002" />
<Confrom="27" weight="-1.78834415996319e-003" />
<Confrom="28" weight="1.65906037641778e-001" />
<Confrom="29" weight="-1.22794031285820e-001" />

<Confrom="30" weight="3.11598617324397e-001" />
<Confrom="31" weight="-2.46468031522757e-001" />
<Confrom="32" weight="5.13903770294033e-002" />
<Confrom="33" weight="2.38440175796516e-002" />
<Confrom="34" weight="-7.13021533650929e-003" />
<Confrom="35" weight="1.05556161600186e-001" />
<Confrom="36" weight="-6.00080673995610e-002" />
<Confrom="37" weight="-1.42142374400469e-002" />
<Confrom="38" weight="-4.23100886222071e-002" />
<Confrom="39" weight="4.69586642494407e-001" />
<Confrom="40" weight="-3.79333799078227e-001" />
<Confrom="41" weight="-5.30603006929613e-002" />
<Confrom="42" weight="8.65053212570368e-002" />
<Confrom="43" weight="4.09293068656326e-002" />
<Confrom="44" weight="-6.66869267471425e-002" />
<Confrom="45" weight="-1.76647057916544e-001" />
<Confrom="46" weight="-4.88022289242971e-002" />
<Confrom="47" weight="2.87020131772874e-001" />
<Confrom="48" weight="-1.62441036264296e-002" />
<Confrom="49" weight="1.26394512652655e-002" />
</Neuron>
<Neuron id="69" bias="2.97136015007218e-001">
<Confrom="0" weight="3.26635365908481e-001" />
<Confrom="1" weight="3.27817765289122e-001" />
<Confrom="2" weight="-1.59517170260365e-001" />
<Confrom="3" weight="1.78800399444424e-001" />
<Confrom="4" weight="-1.11572939242255e-003" />
<Confrom="5" weight="-1.17928525110033e-001" />
<Confrom="6" weight="-9.98327308575001e-003" />
<Confrom="7" weight="7.79617889370647e-002" />
<Confrom="8" weight="1.73775434974570e-001" />
<Confrom="9" weight="2.03602341182414e-001" />
<Confrom="10" weight="-3.87237980869989e-002" />
<Confrom="11" weight="-2.93125388206596e-002" />

<Confrom="12" weight="3.06698266371243e-001" />
<Confrom="13" weight="-2.80455798150794e-001" />
<Confrom="14" weight="7.92802472015913e-002" />
<Confrom="15" weight="3.48975370603722e-001" />
<Confrom="16" weight="1.37562362904263e-001" />
<Confrom="17" weight="5.23095335131653e-002" />
<Confrom="18" weight="-9.64797438211712e-002" />
<Confrom="19" weight="2.40336156328605e-001" />
<Confrom="20" weight="9.48396637798536e-002" />
<Confrom="21" weight="3.58907237415115e-001" />
<Confrom="22" weight="-1.99028285601285e-001" />
<Confrom="23" weight="8.38287482508470e-002" />
<Confrom="24" weight="3.32260396065812e-002" />
<Confrom="25" weight="7.84298310990152e-002" />
<Confrom="26" weight="2.41314678368048e-001" />
<Confrom="27" weight="1.13960891587756e-001" />
<Confrom="28" weight="-3.24412638727369e-001" />
<Confrom="29" weight="2.52849637725792e-001" />
<Confrom="30" weight="-1.16443395344334e-001" />
<Confrom="31" weight="-1.25143507518233e-003" />
<Confrom="32" weight="1.70319335619365e-001" />
<Confrom="33" weight="1.01291544415288e-001" />
<Confrom="34" weight="1.92928885686097e-001" />
<Confrom="35" weight="7.39954403150497e-003" />
<Confrom="36" weight="5.91558470786705e-002" />
<Confrom="37" weight="1.64816900678928e-003" />
<Confrom="38" weight="2.14812559704015e-001" />
<Confrom="39" weight="-3.42588956853866e-002" />
<Confrom="40" weight="1.40815832990283e-001" />
<Confrom="41" weight="8.09389681883755e-002" />
<Confrom="42" weight="5.90674145736491e-001" />
<Confrom="43" weight="-1.38274330356085e-002" />
<Confrom="44" weight="-4.28239893897318e-001" />
<Confrom="45" weight="2.70113560110579e-001" />

```
<Confrom="46" weight="3.70202334155128e-002" />
<Confrom="47" weight="-1.73030326967936e-002" />
<Confrom="48" weight="2.15510315016048e-001" />
<Confrom="49" weight="6.51953696791189e-002" />
  </Neuron>
```

```
</NeuralLayer>
```

```
⌌<NeuralLayer numberOfNeurons="1" activationFunction="tanh">
```

```
⌌<Neuron id="70" bias="8.57413866945180e-001">
```

```
<Confrom="50" weight="4.21943781825755e-001" />
<Confrom="51" weight="8.32353263950112e-001" />
<Confrom="52" weight="-8.78875343532833e-001" />
<Confrom="53" weight="-6.65843309581738e-001" />
<Confrom="54" weight="6.01123382107757e-001" />
<Confrom="55" weight="4.17400671958468e-001" />
<Confrom="56" weight="-1.65317367937413e-001" />
<Confrom="57" weight="3.89710169124629e-001" />
<Confrom="58" weight="-4.34485929075729e-001" />
<Confrom="59" weight="2.38379147489964e-001" />
<Confrom="60" weight="1.62929733679453e-001" />
<Confrom="61" weight="-4.22159147524513e-001" />
<Confrom="62" weight="-3.53269312602570e-001" />
<Confrom="63" weight="-1.10914256904126e+000" />
<Confrom="64" weight="-2.71517995462500e-001" />
<Confrom="65" weight="-7.35764383021694e-001" />
<Confrom="66" weight="5.50875652466898e-001" />
<Confrom="67" weight="-3.45716580836780e-001" />
<Confrom="68" weight="1.23792053013137e-001" />
<Confrom="69" weight="7.06497170538357e-001" />
```

```
</Neuron>
```

```
</NeuralLayer>
```

```
⌌<NeuralOutputs numberOfOutputs="1">
```

```
⌌<NeuralOutput outputNeuron="70">
```

```
⌌<DerivedField optype="continuous">
```

```
⌌<NormContinuous field="dG" shift="1,00000000000000e+000" scale="3,33333333333333e-002">
```

<LinearNormorig="-3.000000000000e+001" norm="0.000000000000e+000" />

<LinearNormorig="0.000000000000e+000" norm="1.000000000000e+000" />

</NormContinuous>

</DerivedField>

</NeuralOutput>

</NeuralOutputs>

</NeuralNetwork>

</PMML>