

САРКИСЯН ВАРУЖАН АМБАРЦУМОВИЧ

**РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛЕНИЯ ПИЩЕВЫХ МАСЛОЖИРОВЫХ
ПРОДУКТОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ИХ КОНТРОЛЯ**

14.02.01 – Гигиена

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории Пищевых биотехнологий и специализированных продуктов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, г. Москва.

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

доктор биологических наук,
зав. лабораторией химии
пищевых продуктов,
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

Бессонов Владимир Владимирович

доктор технических наук, профессор,
зав. лабораторией пищевых биотехнологий
и специализированных продуктов
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

Кочеткова Алла Алексеевна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, ФБУН
"Федеральный научный центр гигиены
им. Ф.Ф.Эрисмана", Зав. отделом
аналитических методов контроля

Федорова Наталья Евгеньевна

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМТН, Орловский государственный
институт экономики и торговли, зав. кафедрой
технологии, организации и гигиены питания

Зубцов Юрий Николаевич,

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова.

Защита диссертации состоится в режиме он-лайн "30" июня 2016 г. в 13:30 на заседании диссертационного совета Д 208.133.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Минздрава России по адресу: 119121, г.Москва, ул.Погодинская, д.10, строение 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно – исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Минздрава России и на сайте Института www.sysin.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2016г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Ингель Фаина Исааковна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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. 2009-2015, Shahidi F. 2005-2014, Lee J.H. 2012].

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. 1949-1981, Лисицын А.Н. 2000-2013, Andreou A. 2009, Kanehisa M. 2000-2014, Billek J 1980].

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 1983-1994]. 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) [Tabee E 2009, Stevenson S.G. 1984, Gutierrez 1988].

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 [Eder E. 1992-2000, Esterbauer H. 1991, Nolen 1967-1973].

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, в случае дисперсных жировых продуктов требуется экстракция жировой фазы, 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].

Таким образом, имеет место существенный недостаток методического и нормативного обеспечения для контроля и регулирования безопасности масел, жиров и жировых продуктов, что определяет актуальность и своевременность исследований и разработок в этой области.

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.

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 *insitu* 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 РФФИ (Проект № 14-36-00041).
7. Разработка специализированного липидного модуля выполнена в рамках гранта РФФИ (Проект « 14-16-00055).

Практическая значимость работы

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 смеси 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.

Положения, выносимые на защиту

1. Общее содержание антиоксидантов(токоферолов и фосфолипидов) находится в тесной корреляции с содержанием α -линоленовой кислоты в нативных липидных системах ($r_{\text{тф}}^2=0,8636$, $r_{\text{фл}}^2=0,9167$, $p<0,05$). Использование этих антиоксидантов в установленных соотношениях обеспечивает оптимальные условия регулирования процессов окисления пищевых масложировых продуктов.
2. Оптимальным для контроля автоокислительных процессов в дисперсных жировых продуктах является разработанный принцип дифференциальной оценки степени развития процессов перекисного окисления липидов, основанный на параллельном измерении перекисного числа и потребления молекулярного кислорода в условиях *insitu*, без предварительной экстракции липидов из исследуемого объекта.
3. Для оценки безопасности фритюрных масел и жиров может быть использован гигиенический показатель содержания общих полярных веществ, адекватно отражающий развитие окислительных, гидролитических и термических процессов порчи фритюрных жиров.
4. Флавоноиды могут выступать в качестве ингибиторов развития процессов ферментативного окисления в нерафинированных маслах и масличном сырье. Наиболее активными антиоксидантами являются халкон, 2-гидроксихалкон, лютеолин, а также хризин и байкалеин.

Апробация материалов диссертации. 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).

Личный вклад автора. При планировании, организации и проведении исследований по всем разделам работы доля личного участия автора составила 90%. Анализ фактического материала и обобщение результатов полностью проведены автором работы.

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.

Структура и объем 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 английском.

ОБЪЕКТЫ, ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись растительные масла, используемые для получения пищевых эмульсий, фритюрные жиры, используемые для жарки пищевых продуктов в условиях предприятий общественного питания и промышленного производства пищевых продуктов, препараты антиоксидантов, а также модели лигандов и липоксигеназы-1 сои.

Материалы, методы и объем исследования. Применялись физико-химические и статистические методы анализа, методы виртуального скрининга, а также методы математического моделирования с применением искусственных нейронных сетей и регрессионных деревьев принятия решений. Основные направления, объекты, методы, а также количественная характеристика объема исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные направления, объекты, методы и объем исследований

Направление исследований	Объекты исследований	Методы анализа	Объем исследований
1. Разработка объектно-ориентированной базы данных химического состава растительных и животных масел и жиров	<i>Международные и национальные документы:</i> FDA Federal Regulations, European Commission Regulations, Codex Alimentarius Standards, документы FAO <i>Данные о химическом составе:</i> российские и международные открытые базы данных химического состава масел и жиров, статьи в рецензируемых журналах	Экспертиза информации; Статистический анализ данных; Нисходящий анализ для разработки базы данных	Проанализировано 15 нормативных документов, 6 открытых баз данных, 72 публикации; Внесено в базу данных 5 172 ед. инф.
2. Анализ гигиенических показателей качества и безопасности при окислении дисперсных жировых продуктов	Пищевые эмульсии прямого и обратного типа; Мицеллированные антиоксиданты	ИК-спектроскопия с преобразованиями Фурье; УФ-спектроскопия; титриметрия; определение окислительной стабильности по интенсивности потребления молекулярного кислорода	36 проб 332 ед. инф.
3. Разработка принципа дифференциальной оценки развития процессов перекисного окисления липидов	Пищевые эмульсии	Определение окислительной стабильности по интенсивности потребления молекулярного кислорода	30 проб 150 ед. инф.
4. Анализ индикаторов для оценки	Лабораторные модели жарки	<i>Арбитражные методы:</i> определение кислотного и	56 проб 1 212 ед. инф.

Направление исследований	Объекты исследований	Методы анализа	Объем исследований
гигиенических рисков при использовании фритюрных жиров	Непрерывная жарка в производственных условиях	перекисного чисел <i>Скрининговые методы:</i> жидкостная колоночная	52 пробы 156 ед. инф.
	Периодическая жарка в условиях сети общественного питания	хроматография, рефрактометрия, спектрофотометрия, сенсорный анализ	210 проб 1 032 ед. инф
5. Разработка метода выполнения измерений общих полярных веществ во фритюрных жирах	Фритюрные жиры	Жидкостная колоночная хроматография; определение диэлектрической проницаемости	36 проб 144 ед. инф.
6. Скрининговые исследования активности ингибиторов липоксигеназы -1 soi	Данные об ингибиторах липоксигеназ из открытых рецензируемых источников; Липоксигеназа-1 soi; Ингибиторы полифенольной природы	Молекулярный докинг малых молекул с ферментами	106 лигандов 3 280 ед. инф.
7. Выявление взаимосвязи между структурой и способностью флавоноидов к ингибированию липоксигеназной активности	Данные скрининговых исследований	Математическое моделирование зависимости между структурой и свойствами флавоноидов с применением искусственных нейронных сетей и регрессионных деревьев принятия решений	7 034 ед. инф.
Всего		18 512 ед. инф.	

Разработка базы данных химического состава масел и жиров растительных и животных осуществлялась в среде приложения PHPMyAdmin под операционные системы Windows, Linux, Mac OS X для IBM PC-совмест. ПК.

Определение показателей безопасности эмульсионных жировых продуктов и фритюрных жиров проведено в соответствии с ASTM E1627–11, СанПиН 2.3.6.1079-01, ГОСТ 53099-2008,

ГОСТ Р 52110-2003, ГОСТ ИСО 8420–2013, а также инструкциями по жарке изделий во фритюре в предприятиях общественного питания и контролю за качеством фритюрных жиров (1990 г.).

Оценку потребления кислорода жировыми продуктами определяли в реакторе окислительной стабильности OXITEST при давлении кислорода в камерах реактора, равном 6 бар, постоянной температуре $80 \pm 0,1$ °C, шагом регистрации снижения давления в камерах, равным 1 мин. Для определения периода индукции исследованных образцов использовали метод графов.

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.

Мониторинг процессов периодической жарки пищевых продуктов был осуществлен на базе 5 предприятий общественного питания в Юго-Восточном, Юго-Западном, Западном и Центральном административных округах Москвы, при отборе проб масел трижды в день в течение двух недель.

Оценку изменений показателей окислительной и гидролитической порчи фритюрных жиров в условиях непрерывной жарки проводили на предприятии по производству снековой продукции в Северо-Восточном административном округе Москвы. Отбор проб проводили в течение 4 рабочих смен, в первую смену отбор проб проводили каждый час, в последующие – каждые два часа. Общая продолжительность жарки составила 41 час.

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

Для проведения скрининговых исследований активности ингибиторов липоксигеназы-1 сои были использованы данные рентгеноструктурного анализа из открытой базы данных RCSB; сведения о структуре, а также данные об активности ингибиторов были получены из открытых ресурсов PubChem и BindingDB. С целью подготовки объектов исследований, определения активного центра фермента, генерации конформаций лигандов, а также проведения оценки эффективности ингибирования был использован программный комплекс LeadIt (BioSolveIT, Германия).

При выявлении взаимосвязи между структурой и способностью флавоноидов к ингибированию липоксигеназной активности был использован модуль «Искусственные нейронные сети», входящий в состав программы Statistica 10. В качестве критериев согласия прогностической системы были использованы статистические критерии: среднеквадратическая ошибка (СКО), среднеабсолютная ошибка (САО), среднеотносительная квадратическая ошибка

(СОКО), среднеотносительная абсолютная ошибка (СООАО) и коэффициент корреляции Пирсона.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

На основании сформированных к источникам литературы требований было проведено обобщение имеющихся данных о химическом составе растительных и животных масел и жиров. Полученные сведения были организованы в виде реляционной базы данных, связывающей информацию о жирнокислотном составе отдельных типов масел и жиров с данными о содержании в них токоферолов и фосфолипидов (рис. 1).

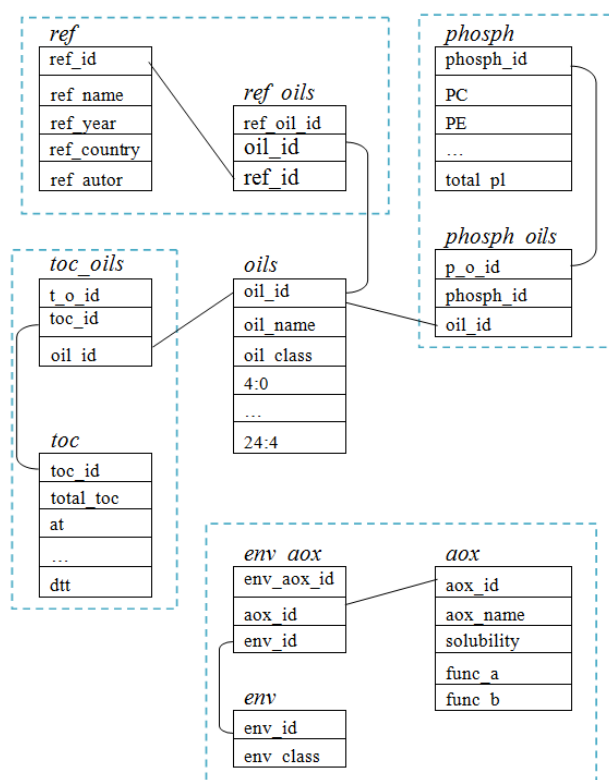


Рисунок 1 – Схематическое отображение структуры базы данных (oils - масла, toc - токоферолы, aox - антиоксиданты, phosph – фосфолипиды, ref - источники)

Накопленный в базе данных массив информации позволил провести корреляционный анализ, который выявил статистически значимые взаимосвязи между степенью ненасыщенности масел и жиров (по содержанию α -линоленовой кислоты (АЛК) и содержанием токоферолов и фосфолипидов, составляющих основу системы антиоксидантной защиты в нативных липидных объектах. Результаты статистического анализа представлены на рисунке 2 в виде иерархического дерева взаимосвязей. В результате исследований было установлено, что наиболее тесная корреляция наблюдается между содержаниями АЛК и δ - и γ -токоферолами, а также между содержанием АЛК и общим содержанием токоферолов и фосфолипидов.

Соблюдение выявленных соотношений «АЛК:Общие токоферолы» и «АЛК: Общие фосфолипиды» было принято в качестве необходимого условия для эффективной регуляции окислительных процессов в нативных липидных системах.

Используя сведения о жирнокислотном составе и результаты корреляционного анализа, методами математической комбинаторики были разработаны рецептуры пищевых эмульсионных жировых продуктов, предназначенных для диетотерапии алиментарнозависимых заболеваний. Данные продукты, зарегистрированы в виде результата интеллектуальной

деятельности (Заявка на патент РФ на изобретение рег. № 2014148929 от 05.12.2014) и получили соответствующее промышленное внедрение на территории Российской Федерации (табл. 2 – рецептуры 4 и 2 соответственно).

Благодаря большому массиву обобщенной информации, стал возможным подбор таких комбинаций масел и жиров, которые позволили оптимизировать жирнокислотный состав продукта не только по соотношению ω -3 и ω -6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК),

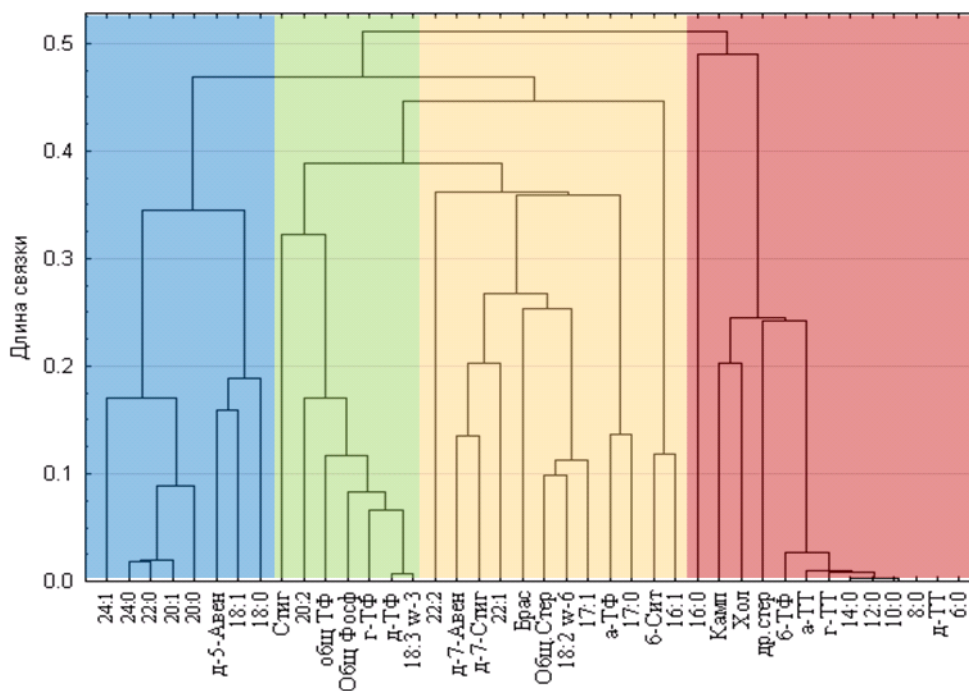


Рисунок 2 – Иерархическое дерево взаимосвязей содержания жирных кислот, фосфолипидов, стеролов и токоферолов в растительных маслах (ТФ – токоферол, ТТ – токотриенол, Фосф – фосфолипиды, Стер – стерины, Стиг – стигмастерол, Авен – авенастерол, Камп – кампстерол, Хол – холестерол). Коэффициенты линейной корреляции (r^2): АЛК : γ -ТФ = 0,9210; АЛК : δ -ТФ = 0,9935; АЛК : общ.ТФ = 0,8636; АЛК : общ.Фосф = 0,9167

но и по таким важным критериям как соотношение насыщенных, моно- и полиненасыщенных жирных кислот, а также по вкладу отдельных жирных кислот в общую калорийность жирового продукта. Указанные критерии являются основой для поддержания нормальной функции сердечно-сосудистой и нервной систем организма человека.

Таблица 2 – Жирнокислотные составы разработанных продуктов

Жирная кислота	Формула	Рецептура №2	Рецептура №4
Капроновая (Гексановая)	6:0	0,131	0.022
Каприловая (Октановая)	8:0	2,734	0.457
Каприновая (Декановая)	10:0	2,434	0.466
Лауриновая (Додекановая)	12:0	18,452	3.335
Миристиновая (Тетрадекановая)	14:0	7,272	1.817
Пальмитиновая (Гексадекановая)	16:0	12,275	4.344

Жирная кислота	Формула	Рецептура №2	Рецептура №4
Пальмитолеиновая (Гексадеценовая)	16:1 ω7	0,166	0.233
Маргариновая (Гептадекановая)	17:0	0,028	0.044
Гептадеценовая	17:1 ω8	0,028	0.044
Стеариновая (Октадекановая)	18:0	2,552	4.233
Олеиновая (Октадеценовая)	18:1 ω9	33,027	74.396
Линолевая (Октадекадиеновая)	18:2 ω6	19,956	8.594
α-Линоленовая (Октадекатриеновая)	18:3 ω3	2,494	0.139
Арахидиновая (Эйкозеновая)	20:0	0,366	0.317
Эйкозеновая (Гондоиновая)	20:1 ω9	0,629	0.273
Эйкозадиеновая	20:2 ω6	0,009	0.000
Бегеновая (Докозеновая)	22:0	0,166	0.932
Эруковая (Доказеновая)	22:1 ω13	0,190	0.133
Докозадиеновая	22:2 ω6	0,009	0.000
Лигноцериновая (Тетракозеновая)	24:0	0,159	0.222
Нервоновая (Тетракозеновая)	24:1 ω9	0,038	0.005
Докозагексаеновая	22:6 ω 3	0,000	3.050

При регулировании окислительных процессов в жировых продуктах необходим надлежащий контроль гигиенических показателей, который при определенных технологических режимах обработки затруднен или неосуществим. Наиболее яркими примерами являются дисперсные жировые продукты и фритюрные жиры.

Анализ гигиенических показателей качества и безопасности при окислении дисперсных жировых продуктов

Анализ гигиенических показателей качества и безопасности был осуществлен при помощи стандартных титриметрических методов. На результаты измерений данных показателей существенное влияние оказывают присутствие в пищевом матриксе веществ нелипидной природы, таких как красители, фенольные соединения, влага и молекулярный кислород.

В качестве объектов исследования были выбраны антиоксиданты в мицеллярной форме, как системы, в которых определение искомых гигиенических показателей наиболее затруднено в силу особенностей их химического состава и фазовой гетерогенности. Исследуемые образцы мицеллярных антиоксидантов содержали дистиллированную воду, полисорбат 20 и полисорбат 80 в качестве эмульгаторов.

Проведенные исследования позволили установить, что значения перекисных и кислотных чисел в образцах антиоксидантов значительно превышают установленные для масел и жиров нормативы, достигая 220 мэкв[О]/кг и 15,3 мг КОН/г соответственно (рис. 3).

Было также установлено, что внесение мицеллярных антиоксидантов в растительное масло в функционально значимых концентрациях (50-400 мг/кг) существенно затрудняет определение как перекисного, так и кислотного числа, вызывая непосредственно после внесения статистически достоверное повышение значений данных показателей ($p < 0.001$).

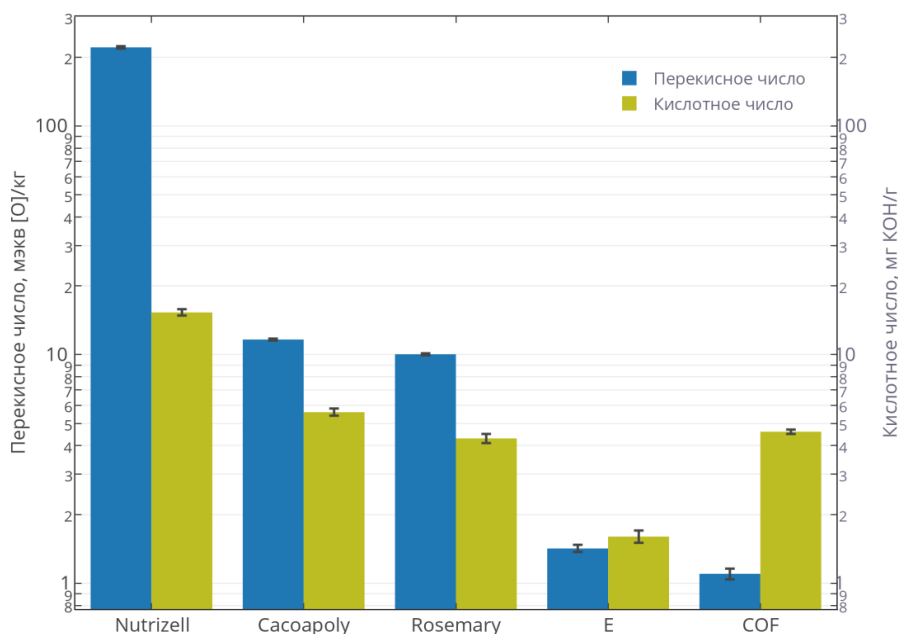


Рисунок 3 – Значения перекисных и кислотных чисел мицеллярных форм антиоксидантов

В эксперименте с продолжительным хранением растительного масла при высокой температуре (24 часа при 80 °C) без внесения антиоксидантов и с внесением мицеллярных форм антиоксидантов было показано, что только в образцах масел с наименьшим содержанием антиоксидантов наблюдалось снижение роста перекисных и кислотных чисел, в остальных случаях наблюдался обратный эффект.

Проведенные исследования демонстрируют, что нормативно установленные методы определения перекисного и кислотного чисел не способны достоверно оценить развитие процессов перекисного окисления липидов и образования свободных жирных кислот в многокомпонентных жировых продуктах.

С целью исключения влияния на результаты измерений содержащихся в маслах веществ нелипидной природы была проведена оценка прямого потребления молекулярного кислорода, имеющего специфический характер для липидов независимо от присутствия посторонних примесей.

Разработка принципа дифференциальной оценки развития процессов перекисного окисления липидов

Потребление кислорода образцом жирового продукта определяется по изменению давления в камере реактора OXITEST (рис. 4). При этом только для веществ липидной природы 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.

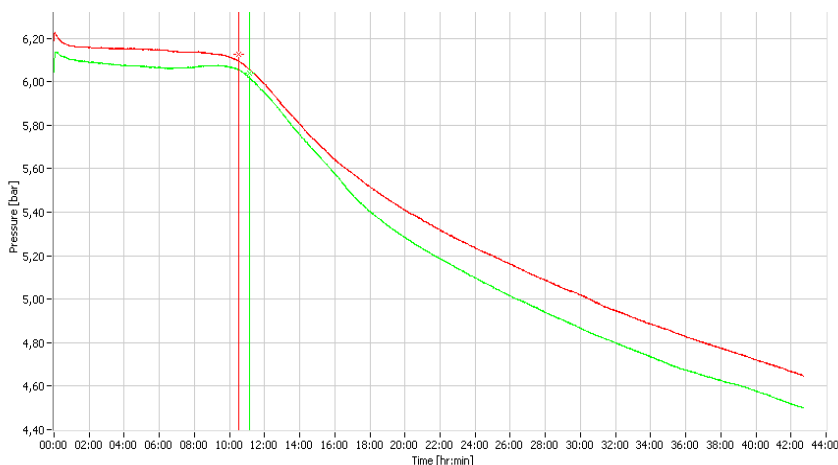


Рисунок 4 – Типичная кривая падения давления кислорода в камере реактора (на примере образцов сливочного масла); вертикальной линией обозначено окончание периода индукции

Для установления соответствия динамики накопления продуктов окисления липидов при нормальных условиях и при избытке кислорода, образцы жирового продукта до и после окисления в камере реактора были проанализированы методом ИК-спектроскопии с преобразованиями Фурье. В качестве образца жирового продукта было использовано соевое масло с внесенным витамином Е в мицеллярной форме (рис. 5).

Анализ полученных спектров свидетельствует о повышении содержания О-Н связей (продукты перекисного окисления), снижении содержания С-Н связей при ненасыщенной С=С связи (образование продуктов вторичного окисления), также отмечено снижение содержания карбониллов эфирной группы и закономерное повышение содержания свободных жирных кислот.

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 стандартном условии хранения и при окислении в избытке кислорода.

Для исследования были подготовлены образцы подсолнечного масла, содержащие антиоксиданты NovaSol COF, d- α -Токоферол в виде растворов (не в мицеллярной форме), NovaSolRosemary, NovaSolCacoapoly, NovaSol E, NovaSolNutrizellChia, в концентрациях, рекомендованных производителем, и контрольный образец, не содержащий антиоксидант. Оба

исследования проводили при 80 °С. 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. 6).

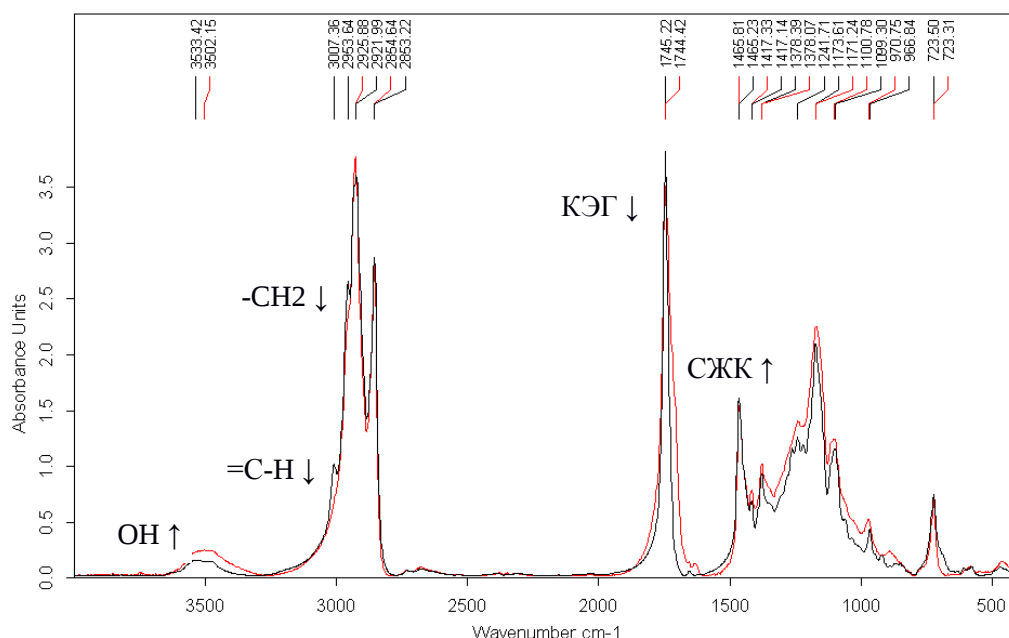


Рисунок 5 – ИК-спектры соевого масла с мицеллярной формой витамина Е до (обозначено черным цветом) и после (обозначено красным цветом) окисления в камере реактора. Рядом с пиками указана динамика в содержании соответствующих функциональных групп, ответственных за изменения спектров (СЖК – свободные жирные кислоты, КЭГ – карбонил эфирной группы)

Анализируя результаты исследований в обоих экспериментах, можно заключить, что высокие значения перекисного числа в образцах масел с антиоксидантами NovaSol COF, NovaSolRosemary, NovaSolCacoapoly и NovaSol E связаны не с высоким содержанием продуктов перекисного окисления липидов, а с присутствием посторонних примесей нелипидной природы в образцах антиоксидантов. Для образца антиоксиданта NovaSolNutrizellChia высокие значения перекисного числа связаны, очевидно, с содержанием продуктов перекисного окисления.

Таким образом, результаты исследований демонстрируют, что с целью исключения влияния веществ нелипидной природы на значения показателей перекисного и кислотного чисел при изучении дисперсных жировых продуктов целесообразным является дополнительное к стандартным определение показателя периода индукции.

Анализ индикаторов для оценки гигиенических рисков при использовании фритюрных жиров

Анализ существующих российских и зарубежных методов оценки качества и безопасности фритюрных жиров выявил большое разнообразие применяемых показателей, среди которых:

органолептическая оценка, кислотное число (или тест-полоски), коэффициент экстинкции при 232 нм, показатель преломления, реакция с окислительно-восстановительным индикатором, а также содержание общих полярных веществ. При этом, общим для всех стран является органолептический анализ, который обычно является вторичным относительно основного инструментального метода.

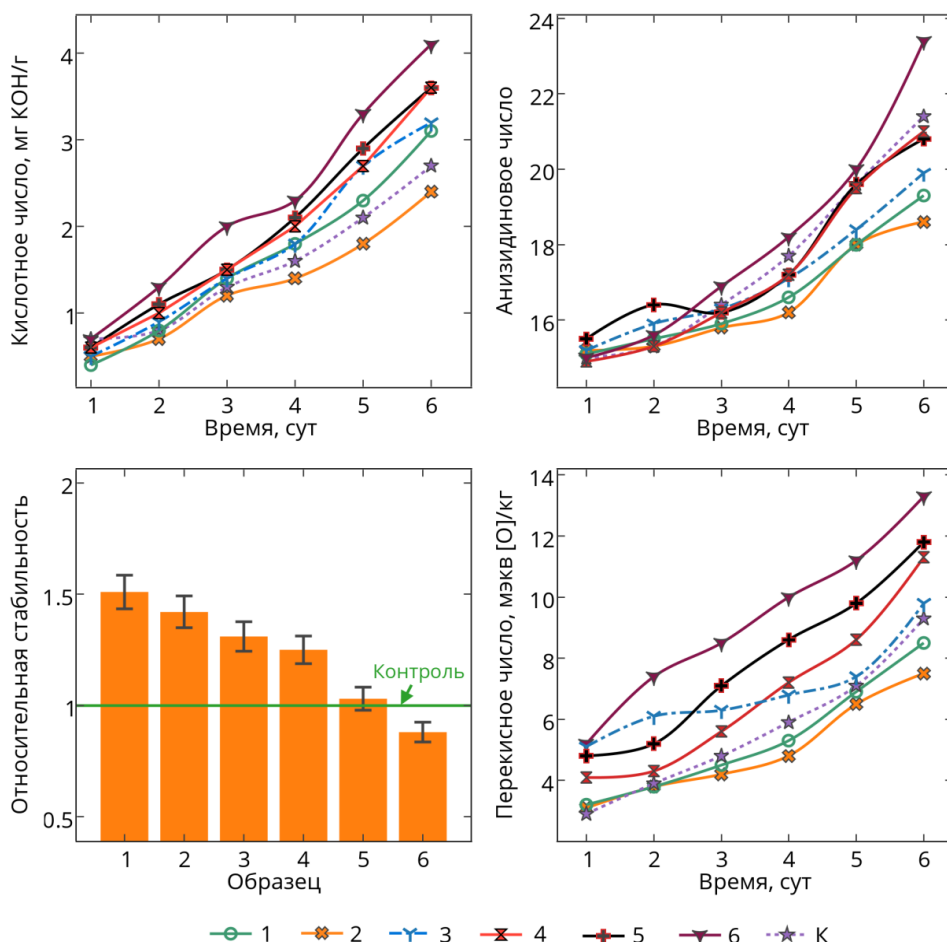


Рисунок 6 – Значения относительной стабильности, перекисных, кислотных и анизидиновых чисел образцов подсолнечного масла (К – контрольный образец без антиоксиданта, образцы 1-6 – подсолнечное масло с внесенными антиоксидантами NovaSol COF, d- α -Токоферол, NovaSol Rosemary, NovaSol Cacoapoly, NovaSol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

Для выявления наиболее значимых индикаторов, процессы жарки во фритюре были воспроизведены в трех условиях: периодическая жарка в лабораторных условиях, периодическая жарка в условиях предприятий общественного питания, и непрерывная жарка в условиях производства снековой продукции. В общей сложности было отобрано и изучено 318 проб фритюрного жира.

При изучении процессов жарки в условиях предприятий общественного питания и производства снековой продукции показано, что при стабильном повышении значений кислотного числа и содержания ОПВ, а также ухудшении органолептической оценки масла,

значение перекисного числа изменялось незначительно и не превышало установленных для масел нормативов. Кислотное число в ряде случаев превышало установленные нормативы после заметного ухудшения органолептических показателей масла.

Жарку пищевых продуктов в лабораторных условиях проводили в течение 21 часа с периодическим отбором проб и их анализом для выявления статистических зависимостей между различными показателями качества и безопасности (табл. 3).

Таблица 3 – Коэффициенты корреляции между показателями окислительной и гидролитической порчи масла в условиях лабораторной жарки

N=36	Анизидиновое число	Кислотное число	Коэффициент экстинкции	Показатель преломления	ОПВ
Анизидиновое число	$\begin{matrix} \text{p} \rightarrow \\ \text{r} \downarrow \end{matrix}$	<0,001	<0,0001	<0,0001	<0.001
Кислотное число	0,9668	$\begin{matrix} \text{p} \rightarrow \\ \text{r} \downarrow \end{matrix}$	<0,0001	0,018	<0.0001
Коэффициент экстинкции	0,8910	0,8466	$\begin{matrix} \text{p} \rightarrow \\ \text{r} \downarrow \end{matrix}$	0.001	<0.0001
Показатель преломления	0,5576	0,3915	0,5381	$\begin{matrix} \text{p} \rightarrow \\ \text{r} \downarrow \end{matrix}$	<0.0001
ОПВ	0,9677	0,945	0,8626	0,6151	$\begin{matrix} \text{p} \uparrow \\ \leftarrow \text{r} \end{matrix}$

p - вероятность ошибочного отклонения нулевой гипотезы, r- коэффициент корреляции.

Анализ полученных результатов выявил тесную взаимосвязь между показателем содержания ОПВ и основными индикаторами риска при использовании фритюрных жиров. Ненормируемый показатель анизидинового числа был использован в качестве индикатора накопления вторичных продуктов окисления.

Основным недостатком исследованных методов является невозможность их практического применения вне лабораторий, что в условиях широкой распространенности процессов жарки во фритюре на предприятиях общественного питания является существенной проблемой, повышая гигиенические риски при использовании фритюрных жиров.

В связи с вышеописанным, была проведена разработка метода выполнения измерений для определения качества и безопасности фритюрных жиров, осуществляемая вне лабораторных условий.

Разработка метода выполнения измерений общих полярных веществ во фритюрных жирах

В основу разработки метода выполнения измерений был положен метод непрямого определения содержания общих полярных веществ при помощи измерения диэлектрической проницаемости масла. В качестве контрольного метода было использовано определение ОПВ при помощи колоночной хроматографии по ГОСТ ИСО 8420–2013.

Основными этапами при разработке метода измерений показателей качества и безопасности фритюрных жиров являлись выбор условий проведения измерений, факторов, мешающих измерению, и диапазонов линейности значений.

Анализ результатов исследования лабораторных образцов фритюрных жиров показал, что температура исследуемого фритюрного жира должна быть 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 обоими методами, вошли значения по 36 пробам (рис. 7).

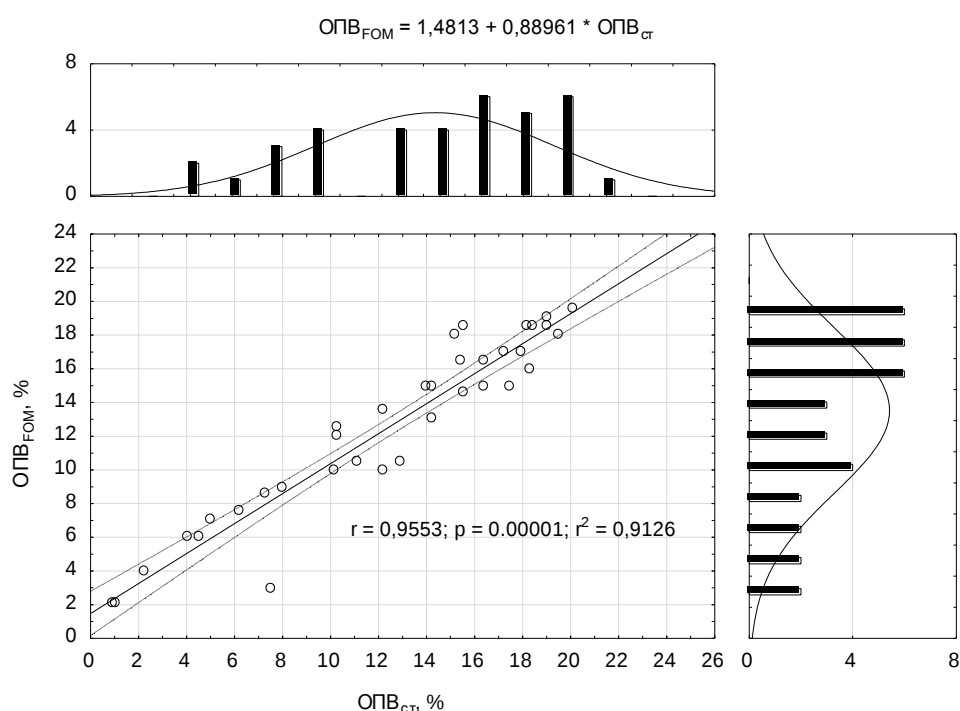


Рисунок 7 – Диаграммы распределения значений ОПВ и взаимосвязи между содержанием ОПВ при измерении стандартным методом ($ОПВ_{СТ}$) и при помощи прибора FOM 320 ($ОПВ_{ФОМ}$)

Установлено, что в диапазоне содержания ОПВ от 4 до 24,0 % наблюдается линейная зависимость между результатами измерений, полученными при помощи контрольного и кондуктометрического методов. При этом, значимое влияние на метаболизм оказывают фритюрные жиры с содержанием ОПВ, равным или превышающим 20 % [CuestaC 1988].

Анализ результатов исследований позволил установить метрологические характеристики метода (табл. 4).

Таблица 4 – Метрологические характеристики метода определения содержания полярных веществ измерением диэлектрической проницаемости

Метрологическая характеристика ($P = 95\%$)	Диапазон измерений, % полярных веществ	
	до 10 включ.	св. 10 до 24 включ.
Предел повторяемости	1,4	2,8

Предел воспроизводимости R	2,8	5,6
Показатель точности (границы абсолютной погрешности) $\pm\delta$	2,0	4,0

На основе проведенных исследований был разработан стандарт (ГОСТ Р 54607.3-2014), регламентирующий набор методов контроля качества фритюрных жиров, включающий метод определения ОПВ кондуктометрическим методом, что сделало возможным проведение надлежащей оценки качества и безопасности фритюрных жиров, применяемых на предприятиях общественного питания и предприятиях по производству снековой продукции.

Использование сведений о необходимом содержании токоферолов и фосфолипидов из разработанной базы данных ограничено управлением автоокислительными процессами в жировых системах, в иных случаях, например, при ферментативном окислении, необходимы антиоксиданты, способные специфично ингибировать соответствующие окислительные ферменты.

Скрининговые исследования активности ингибиторов липоксигеназы-1 сои

В качестве основного подхода для проведения скрининговых исследований был использован метод молекулярного докинга исследуемого фермента с лигандами-ингибиторами ферментативной активности, что позволило проанализировать в общей сложности 106 индивидуальных соединений – потенциальных ингибиторов липоксигеназы-1 сои.

Способность соединений к ингибированию ферментативной активности была определена по значению свободной энергии связывания ($\Delta G_{\text{св}}$) исследуемого лиганда с активным центром фермента. Сравнение расчетных и экспериментальных данных о $\Delta G_{\text{св}}$ для 12 веществ различной химической природы выявило высокую предсказательную способность модели ($r = 0,89$, $r^2 = 0,7970$, $p < 0,0001$) и ее применимость для целей исследования.

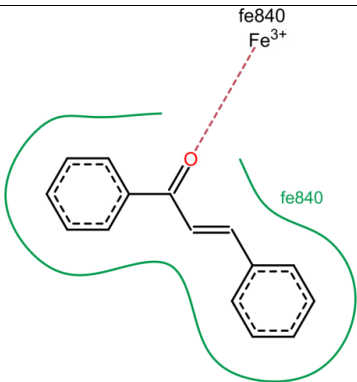
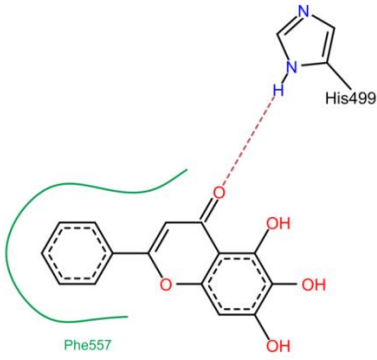
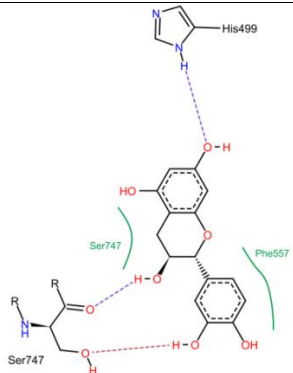
В качестве ингибиторов липоксигеназы были изучены вещества, относящиеся к разным классам флавоноидов, среди них: антоцианидины, антоксантины, ауруны, халконы, дигидрофлаваноны, флаваноны, флавоны, изофлавоны. Результаты исследования некоторых активных лигандов приведены в таблице 5.

По результатам выполненной оценки, лиганды были ранжированы в соответствии со значениями $\Delta G_{\text{св}}$. Предложены механизмы связывания лигандов с активным центром фермента. Показано, что связывание проходит не только с трехвалентным атомом железа (как в случае с халконами), но и за счет сильного связывания с отдельными аминокислотными остатками активного центра (например, Иле⁸³⁹ для протокатеховой кислоты и Фен⁵⁵⁷ для байкалеина).

Показана неспособность связывания некоторых флавоноидов (в гликозилированной форме) с активным центром фермента вследствие стерических ограничений.

На основании данных молекулярного докинга установлено, что наибольшей активностью обладают халкон, 2-гидроксихалкон, лютеолин, хризин и байкалеин, проявляющие активность в наномолярном соотношении к единице липоксигеназной активности.

Таблица 5 – Типовые взаимодействия в фермент-лигандных комплексах

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

Выявление взаимосвязи между структурой и способностью флавоноидов к ингибированию липоксигеназной активности

На первом этапе выявления взаимосвязей все лиганды были организованы в таблице в виде их молекулярных дескрипторов, характеризующих положение и тип заместителей по номеру атома углерода в молекуле флавоноида (рис. 8), а также по наличию двойной связи между 2-м и 3-м атомами углерода и общим количеством гидроксильных, углеводородных и углеводных заместителей.

Используя таблицу молекулярных дескрипторов, методами анализа с использованием искусственных нейронных сетей была разработана прогностическая модель для определения значимости отдельных заместителей при связывании с активным центром липоксигеназы-1 сои (СКО=18,02, CAO=3,62, СОКО=0,45, СОАО=0,54, $r=0.917$).

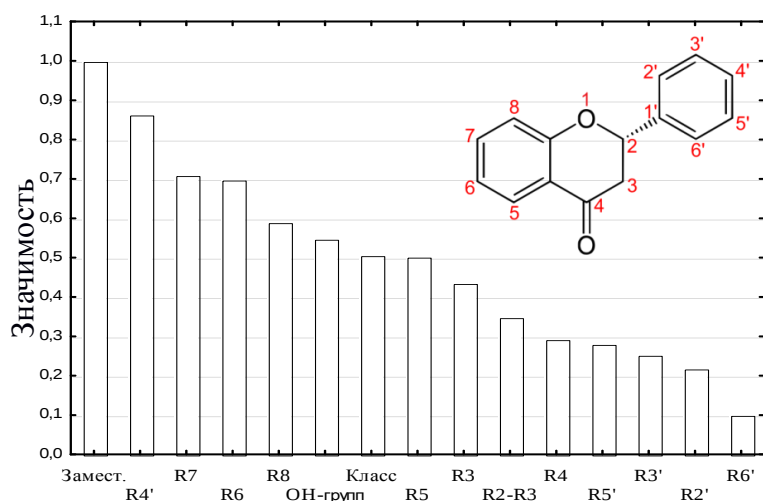


Рисунок 8 – Принятая нумерация углеродных атомов в молекуле полифенола и значимость молекулярных дескрипторов при оценке ингибирующей способности (Замест. – общее количество заместителей, ОН-групп – общее количество гидроксильных групп, R2-R3 – наличие двойной связи между вторым и третьим атомами углерода)

Результаты анализа свидетельствуют о том, что наибольший вклад при формировании 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, а также общее количество ОН-групп. Класс соединений, а также тип заместителей при остальных углеродных атомах оказывает не столь значимое влияние на формирование значения $\Delta G_{св}$.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты исследований позволили обосновать следующие рекомендации для предприятий общественного питания, производителей пищевой продукции, органов и организаций Роспотребнадзора, а также научно-исследовательских организаций пищевого профиля:

1. При лабораторной оценке окислительной стабильности дисперсных пищевых жировых продуктов, наряду с показателями перекисного и кислотного чисел, рекомендуется использовать показатель потребления молекулярного кислорода.
2. При проведении контрольно-надзорных мероприятий, лабораторных исследований, а также производственного контроля на предприятиях, осуществляющих жарку во фритюре, рекомендуется применять ГОСТ Р 54607.3-2014 «Услуги общественного питания. Методы лабораторного контроля продукции общественного питания. Часть 3. Методы контроля соблюдения процессов изготовления продукции общественного питания».

3. В качестве ингибиторов липоксигеназной активности в нерафинированных маслах и масличном сырье рекомендуется использовать халкон, 2-гидроксихалкон, лютеолин, хризин или байкалеин в наномолярном соотношении к единице липоксигеназной активности.

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 ($r_{тф}^2 = 0,8636$, $r_{фл}^2 = 0,9167$).
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 *insitu*, 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), методопределения 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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

в ведущих журналах, рекомендованных ВАК

1. **Саркисян В.А.**, Смирнова Е.А., Кочеткова А.А., Бессонов В.В. Синергические взаимодействия антиоксидантов в жировых продуктах // Пищевая промышленность. 2013. № 3. С. 14-17.
2. Смирнова Е.А., **Саркисян В.А.**, Кочеткова А.А. Проблемно-ориентированный персонифицированный подход к разработке новых продуктов // Пищевая промышленность. 2013. № 9. С. 8-12.
3. **Саркисян В.А.**, Смирнова Е.А., Кочеткова А.А. Методы исследования качества фритюрных жиров // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2014. № 2-3. С. 85-88.
4. Коденцова В.М., Кочеткова А.А., Смирнова Е.А., **Саркисян В.А.**, Бессонов В.В. Состав жирового компонента рациона и обеспеченность организма жирорастворимыми витаминами // Вопросы питания, 2014 Том 83, № 6, с. 4-17.
5. Смирнова Е.А., **Саркисян В.А.**, Глазкова И.В., Елизарова Е.В., Керимова М.Г. Органолептический анализ. Исследование влияния продолжительности обучения испытателей на эффективность их работы // Вопросы питания, 2014. Т.83, №6. – С.86-93.

в других изданиях

6. **Sarkisyan V.A.**, Smirnova E.A., Kochetkova A.A., Bessonov V.V., Synergistic Interactions of Antioxidants in Fatty Products // Food Processing Industry. 2013. - №1. - P.18-21
7. **Саркисян В.А.**, Кочеткова А.А. Система антиоксидантной защиты в нативных липидных системах // Вопросы питания (Приложение) 2014, Том 83 №3. – С.263.
8. Смирнова Е.А., **Саркисян В.А.**, Кочеткова А.А. Проблемно-ориентированный персонифицированный подход к разработке новых пищевых продуктов для персонализированной диетотерапии социально-значимых заболеваний // Вопросы питания (Приложение) 2014, Том 83 №3. – С.65-66.
9. **Саркисян В.А.**, Кочеткова А.А., Бессонов В.В. Прогнозирование ингибирующей способности флавоноидов по отношению к липоксигеназе-1 сви // Перспективы развития научных исследований в 21 веке: сборник материалов 8-й международной науч.-практ. конф., Махачкала, 2015 - С. 22-23.

патент

10. Кочеткова А.А., **Саркисян В.А.**, Коденцова В.М., Воробьева И.С., Смирнова Е.А., Воробьева В.М., Глазкова И.В., Сидорова Ю.С., Зорина Е.Е. Заявка на патент на изобретение РФ №2014148929. Специализированный липидный модуль; дата регистрации 05.12.2014.

свидетельство

11. **Саркисян В.А.**, Глазкова И.В., Кочеткова А.А., Смирнова Е.А., Воробьева И.С., Воробьева В.М., Зорина Е.Е. Свидетельство о государственной регистрации базы данных. База данных химического состава растительных масел и животных жиров. №2014-621-466.

нормативные документы

12. **ГОСТ Р 54607.3-2014** Услуги общественного питания. Методы лабораторного контроля продукции общественного питания. Часть 3. Методы контроля соблюдения процессов изготовления продукции общественного питания.

Список сокращений

Авен – авенастерол

АЛК – α -линоленовая кислота

Камп – кампстерол

ОПВ – общие полярные вещества

САО – среднеабсолютная ошибка

СКО – среднеквадратическая ошибка

СОО – среднеотносительная абсолютная ошибка

СОКО – среднеотносительная квадратическая ошибка

Стер – стерины

Стиг – стигмастерол

ТТ – токотриенол

ТФ – токоферол

Фосф – фосфолипиды

Хол – холестерол

ЭЛ – эффективность лиганда