

На правах рукописи

Жижин Николай Анатольевич

**РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА АУТЕНТИФИКАЦИИ ЖИРОВОЙ ФАЗЫ
МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ**

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

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

МОСКВА - 2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном научном учреждении «Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

Научный руководитель:

кандидат технических наук
Юрова Елена Анатольевна

Официальные оппоненты:

Топникова Елена Васильевна

доктор технических наук,
Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова», директор

Старовойтова Ксения Викторовна

кандидат технических наук,
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», кафедра технологии продуктов питания из растительного сырья, доцент

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет»

Защита состоится «26» мая 2020 г. в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу: 109316, Москва, Талалихина, 26.

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

Автореферат разослан «__»____ 2020 года.

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

А.Н. Захаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Идентификация пищевой продукции является важной задачей во всем мире, в том числе это касается и молока и продуктов его переработки. Оценка жировой фазы молочных продуктов проводится по жирнокислотному составу, в отдельных случаях по составу стеринов. Но отсутствие четко обоснованных критериев оценки жировой фазы, в том числе и по жирнокислотному составу (ЖКС) приводит к спорным ситуациям.

Существующие на данный момент стандартизованные методы анализа не решают всей задачи идентификации, а позволяют лишь определить отдельный параметр. При этом полученный результат без учета состава продукта, качественных характеристик используемого молочного сырья не позволяет исчерпывающе ответить на вопрос о составе жировой фазы. Применение в настоящее время для производства молочной продукции помимо растительных жиров, жиров животного происхождения, привело к необходимости введения дополнительных параметров оценки жировой фазы. В ряде работ приводятся данные по применению анализа триацилглицеридов (ТАГ) для выявления жиров немолочного происхождения. Отсутствие нормированных диапазонов по количественному содержанию жирных кислот применительно к молоку и молочным продуктам (молоко сырое, простокваша, питьевое молоко, йогурты, творожные продукты и т.д.) приводит к получению недостоверных результатов измерений.

Следует подчеркнуть, что в последние годы состав жирных кислот жировой фазы продукта изменился с вторичного показателя на одну из основных качественных характеристик конечного продукта. Это обстоятельство послужило основанием для изучения жировой фазы молочного сырья по составу жирных кислот и составу стеринов, поскольку в соответствии с установленными требованиями присутствие фитостеринов является отличительным признаком присутствия растительных жиров в жировой фазе молока. Кроме того, форма холестерина и его состояние в продукте не является идентификационным признаком, что делает метод идентификации несовершенным. В то же время интервалы, установленные для нормализации ЖКС и качественной оценки состава стеринов, не всегда приводят к однозначной оценке жировой фазы сырого молока и молочных продуктов. Поэтому для эффективного контроля жировой фазы молочного сырья и молочных продуктов необходимо разработать объективные критерии его оценки, ввести дополнительные параметры, систематизировать частоту контроля, установить требования и внедрить современные высокоэффективные методы анализа в обязательный контроль.

Большой вклад в исследование данного вопроса внесли ведущие специалисты в химии и аналитике жиров: Н.С. Арутюнян, Ф.А. Вышемирский, Г.С. Инихов, Н.И. Козин, А.П. Нечаев, И.М. Скурихин, Г.В. Твердохлеб, Е.В. Топникова, В.А. Тутельян, Б.Н. Тютюнников, D. Precht, Fontecha J, Jensen R. и др.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является разработка алгоритма аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции для выявления жиров немолочного происхождения.

Достижение поставленной цели было разрешено посредством решения промежуточных задач:

1. Провести анализ научной, патентной и технической информации по методам идентификации жировой фазы молока и молочной продукции;
2. Осуществить набор статистических данных по исследованию жирнокислотного состава и состава триглицеридов сырого коровьего молока с последующей оценкой полученных результатов для установления диапазонов их содержания;
3. Изучить влияние технологических процессов сквашивания и температурной обработки на состав жирных кислот сырого молока;
4. Исследовать на модельных жировых системах динамику изменения жирнокислотного состава и состава триглицеридов молочного жира при замене жирами растительного и животного происхождения;
5. Разработать алгоритм аутентификации жировой фазы молока и молочных продуктов с применением методов газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии;
6. Разработка методик измерений для аутентификации молочного жира с использованием методов капиллярной газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Научная новизна.

- Установлена сезонная и региональная вариативность содержания жирных кислот и триглицеридов в молоке сырье;
- Определены зависимости изменения жирнокислотного и триглицеридного состава молочного жира от технологических параметров его переработки и содержания жиров немолочного происхождения;
- Установлена динамика изменений жирнокислотного состава и состава триглицеридов при замене жирами растительного и животного происхождения;
- На основании предложенного методического подхода разработан алгоритм идентификации жировой фазы объектов исследования с использованием методов хроматографии.

Теоретическая и практическая значимость. Разработаны и внедрены в лабораторную практику методики идентификации жировой фазы молока и молочной продукции с применением современных высокоэффективных методов анализа, это позволило выполнить их последующую стандартизацию:

- ГОСТ 32915-2014 «Молоко и молочная продукция. Определение жирнокислотного состава жировой фазы методом газовой хроматографии»;
- ГОСТ 34456-2018 «Определение состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»;

- Проект ГОСТ «Идентификация жировой фазы молока»;
- В ходе выполнения работы разработана методика измерений «быстрой» газовой хроматографии для анализа состава жирных кислот, определена процедура пробоподготовки и установлены режимы хроматографирования. Обоснована практическая значимость данной методики для применения на входном контроле молока сырья на перерабатывающих предприятиях.

Методология и методы исследования. Результаты исследования основаны на экспериментальных данных, полученных с применением методов капиллярной газовой (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Научные положения, выносимые на защиту. Теоретическое обоснование, разработка и применение алгоритма комплексной оценки жировой фазы молока и молочной продукции с целью аутентификации молочного жира.

Степень достоверности и аprobация результатов. Достоверность экспериментальных исследований подтверждена многократной повторностью, полученных с использованием современных аналитических методов анализа. Осуществлена обработка полученных результатов с применением регрессионного анализа с использованием компьютерного пакета Statistica 6.0.

Исследования проводились на базе лаборатории технохимического контроля (ТХК) Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Исследования проведены на многочисленных образцах молока сырья, полученных с хозяйств Московской области, а также Воронежской, Калужской, Тульской и др. областей. Исследования молочной продукции проведены на выработанной молочной продукции, как в условиях перерабатывающих предприятий, так и в лабораторных условиях.

Аprobация работы. Основные положения и результаты исследования диссертационной работы были предметом докладов и дискуссий на семинарах, научных конференциях и форумах: Научно практическая конференция «Пути интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции в современных условиях» (Волгоград, 2012); Научно практическая конференция «Научный вклад молодых ученых в развитие пищевой и перерабатывающей промышленности АПК» (Москва, 2013); Международная научная конференция «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2015); Научно практическая конференция «Научное обеспечение молочной промышленности» (Москва, 2015); Международная научно-практическая конференция «Современные достижения биотехнологии, актуальные проблемы молочного дела» (Ставрополь, 2015); Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук (Москва, 2016); Международная научно-практическая конференция «Пища, экология, качество» (Красноярск, 2016); Международная научная конференция, посвященная 175-летию К.А. Тимирязева (Москва, 2018) и др.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 статей, из них 4 – в журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов и перечня использованных литературных источников. Работа изложена на 141 страницах машинописного текста, содержит 34 таблиц и 39 рисунков. Список литературы включает 140 источников, из них 90 отечественных и 50 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи диссертации, изложены научная новизна, практическая значимость, положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлены результаты анализа научно-технической литературы, нормативной и технической документации. Проанализирована структура липидов молока. Представлены данные по современному состоянию в сфере контроля жировой фазы молочной продукции. Рассмотрены современные тенденции в области фальсификации жировой фракции молока жирами немолочного происхождения. Описаны основные виды и свойства жиров, применяемых при производстве молочной продукции, а также отражены современные аналитические методы, применяемые для анализа жировой фазы.

На основании литературных данных подтверждена актуальность выбранной темы диссертационной работы и необходимость разработки алгоритма аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции.

Во второй главе изложены подходы к выполнению работы, представлена схема организации исследований (рисунок 1). Приведены используемые методы анализа, лабораторные приборы и оборудование для проведения экспериментальных исследований.

При проведении экспериментальной части исследований были использованы как стандартизованные методы анализа, так и разработанные в ходе выполнения работы. В ходе научно-исследовательской работы было использовано следующее оборудование: газовый хроматограф «Кристаллюкс 4000М» и система высокоеффективной жидкостной хроматографии Gilson Medical Electronics, оборудованный спектрофотометрическим детектором Gilson 118 с переменной длиной волны. В ходе проведения лабораторных исследований для получения объективных результатов все экспериментальные данные были получены с 3-10 кратной повторностью. Полученные данные обрабатывались в прикладных программах Statistica 6,0 и Microsoft Excel.

Для проведения экспериментальных работ были использованы аналитические стандарты: обезвоженный молочный жир (referens standart BCR519), жир пальмовый (United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard CAS №8002-75-3), жир кокосовый (IRMM801), жир говяжий (CAS №8016-28-2). А также многочисленные образцы молока сырья и продуктов переработки молока.

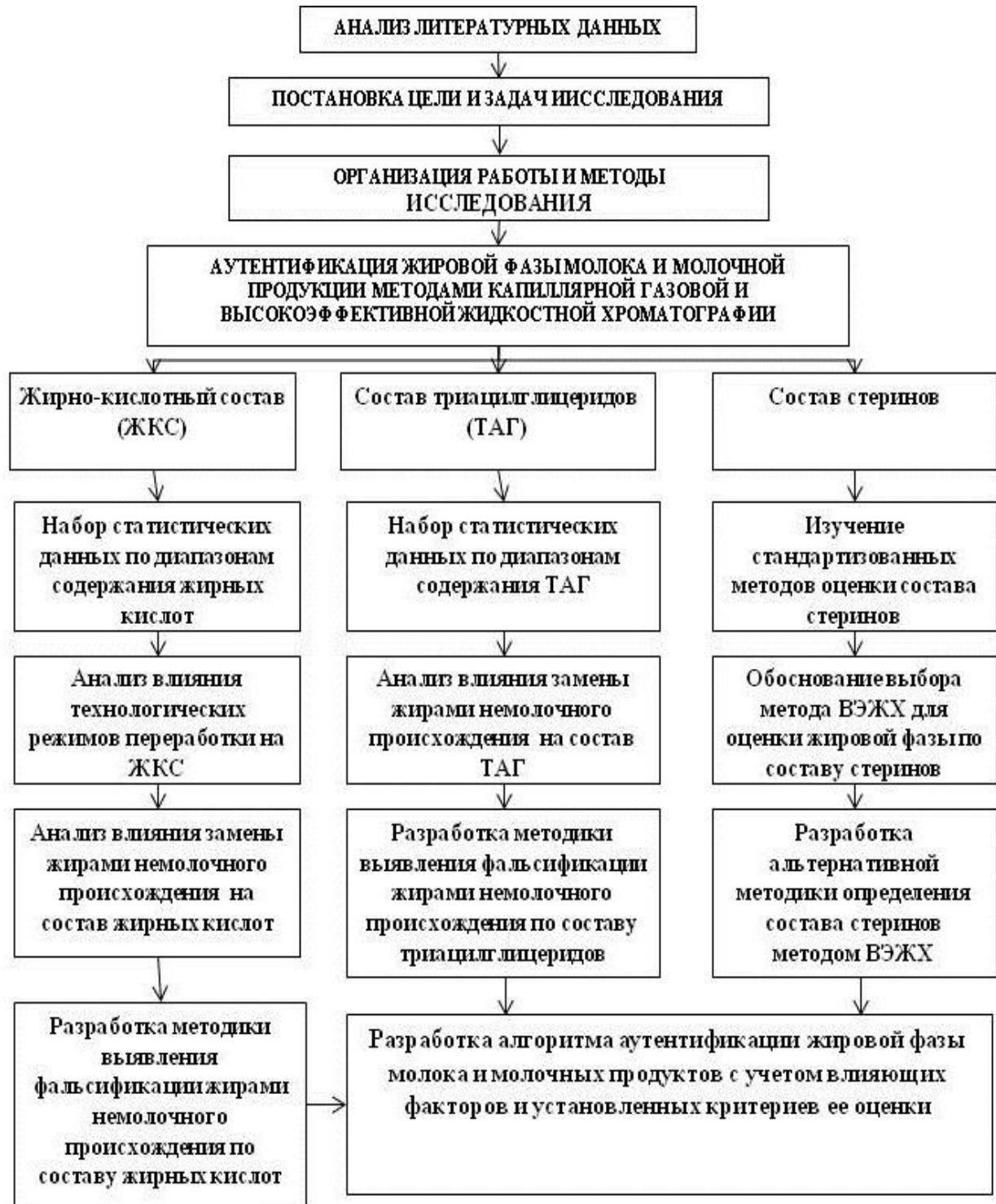


Рисунок 1 - Схема структуры проведения исследований

В третьей главе приведены экспериментальные данные и результаты исследований по оценке состава ЖКС, ТАГ и стеринов.

Полученный массив данных позволил установить диапазоны вариативности ЖКС и ТАГ для жировой фазы молока сырья (таблица 1,2).

Таблица 1 - Диапазоны содержания основных жирных кислот жировой фазы молока сырья

Жирные кислоты	Молоко сырье	Нормы по ГОСТ 32261-2013
Масляная (C_{4:0})	3,0-4,0	2,4-4,2
Капроновая (C _{6:0})	1,5-3,0	1,5-3,0
Каприловая (C _{8:0})	1,0-2,0	1,0-2,0
Каприновая (C _{10:0})	2,0-3,8	2,0-3,8
Децновая (C _{11:0})	0,2-04	0,2-0,4
Лауриновая (C_{12:0})	3,0-4,0	2,0-4,4
Миристиновая (C_{14:0})	10,0-12,0	8,0-13,0
Пальмитиновая (C_{16:0})	30,0-35,0	21,0-35,0
Пальмитоолеиновая (C _{16:1})	1,5-2,4	1,5-2,4
Стеариновая (C_{18:0})	9,0-13,0	8,0-13,5
Элаидиновая (C _{18:1t})	2,0-3,5	Не нормируется
Олеиновая (C_{18:1Cis})	20,0-24,0	20,0-32,0
Линолевая (C_{18:2 Cis})	2,0-3,5	2,2-5,5
Арахиновая (C _{20:0})	До 0,3	До 0,3
Бегеновая (C _{22:0})	До 0,1	До 0,1

Таблица 2 - Диапазоны содержания ТАГ жировой фазы молока сырья

Семейства триглицеридов	Диапазон масс, %	Семейства триглицеридов	Диапазон масс, %
C ₂₄	0,1-0,3	C ₄₀	9-13
C ₂₆	0,5-1	C ₄₂	6,5-7,5
C ₂₈	0,7-1,1	C ₄₄	4,5-7
C ₃₀	1,2-1,7	C ₄₆	5-6,5
C ₃₂	2,5-3,3	C ₄₈	6,5-10
C ₃₄	4-8	C ₅₀	8-12
C ₃₆	9-14	C ₅₂	7-11
C ₃₈	11-15	C ₅₄	2-4

Были проведены исследования по определению влияния технологических режимов переработки на жирнокислотный состав.

Для оценки влияния технологических факторов на жирнокислотный состав жировой фазы молока было исследовано влияние кислотности, процесса сквашивания и температурной обработки.

По результатам исследования было отмечено, что при нарастании кислотности в продукте наблюдается повышение содержания пальмитиновой (C_{16:0}) и олеиновой жирных кислот (C_{18:1}), на 1,75% и 5,56% соответственно. А также снижение масляной (C_{4:0}) и линолевой (C_{18:2 Cis}) кислот (рисунок 2).

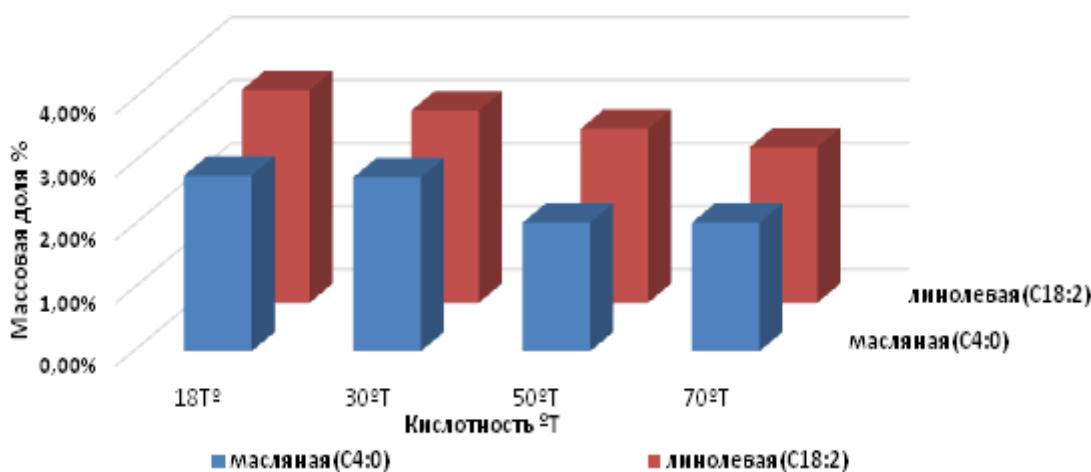


Рисунок 2 - Изменение содержания жирных кислот в жировой фазе молока при нарастании кислотности

Для исследования влияния температурных режимов обработки на жирнокислотный состав молока был проведен эксперимент с применением различных температурных режимов. По результатам проведенных исследований выявлено влияние температуры на жирнокислотный состав жировой фазы молока (рисунок 3).

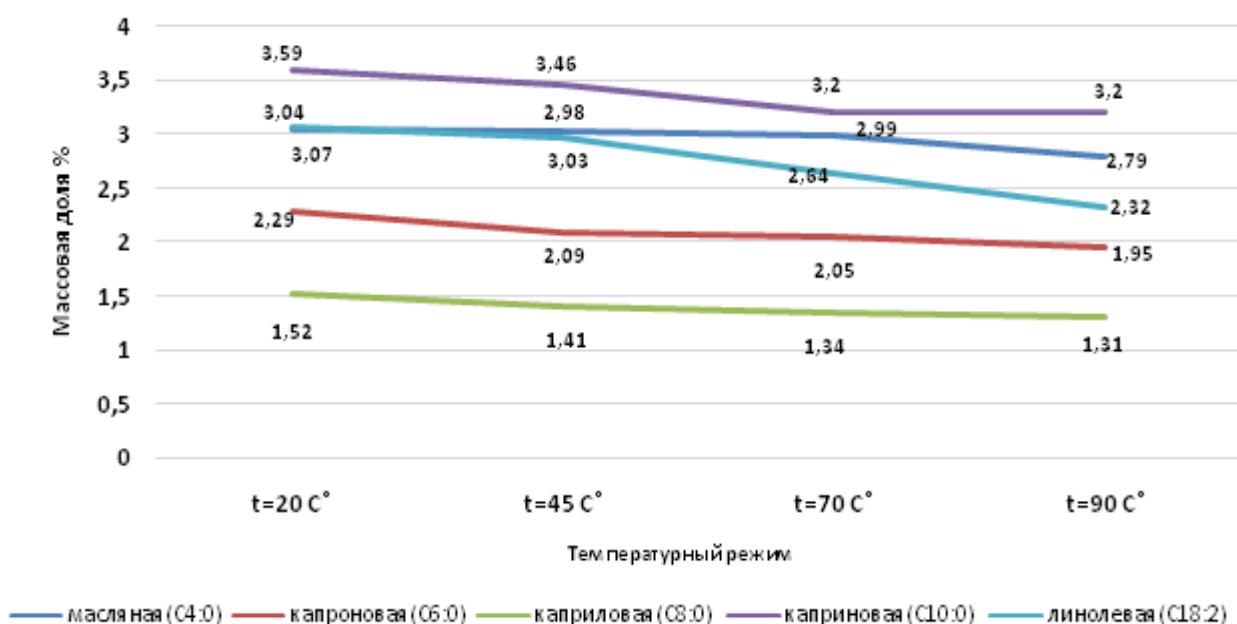


Рисунок 3 - Изменение содержания некоторых жирных кислот в молоке сырье под влиянием температурной обработки

Полученные данные позволили сделать вывод, что жирнокислотный состав жировой фазы молока подвергается изменениям при температурах выше 70°C и выдержкой 30 сек. Значительным изменениям в ходе температурных режимов обработки подвержены насыщенные жирные кислоты с короткой цепью (C₄-C₁₀). Особенно это было выражено, при термической обработке молока сырья, с использованием технологического режима t=90°C с выдержкой

30 сек. В этом случае было обнаружено изменение жирных кислот состава C₄-C₁₀ от 8 до 14%. Значительно снизилось содержание линолевой кислоты (C_{18:2}), на 24% от значений в контрольном образце.

При оценке влияния кислотности во всех экспериментальных образцах кислотность находилась в пределах от 80 до 100 °Т. Было отмечено, что характер изменения содержания жирных кислот имеет ту же направленность, что и в двух предыдущих экспериментах. Наблюдается снижение короткоцепочечных кислот на 5-7% и отмечено значительное снижение линолевой кислоты на 26-33%.

В разделе 3.3 приведены данные по измерению жирнокислотного состава жировой фазы молочных продуктов при замене молочного жира жирами растительного и животного происхождения.

Для этих целей были использованы модельные жировые системы следующего состава: 100% молочного жира (МЖ) → МЖ+10% жира не молочного происхождения (ЖНМП) → МЖ+30% ЖНМП → МЖ+50% ЖНМП → МЖ+70% ЖНМП → МЖ+90% ЖНМП → 100% ЖНМП с последующим измерением состава жирных кислот.

Поскольку пальмовое масло относится к олео-пальмитиновой группе, содержание пальмитиновой и олеиновой кислот в нем может достигать 49% и 48% соответственно. Также пальмовое масло имеет высокое содержание линолевой кислоты до 20%. Этот факт вызывает изменения в составе жирных кислот, которые возникают при введении пальмового масла в жировую фракцию молочных продуктов (рисунок 4).

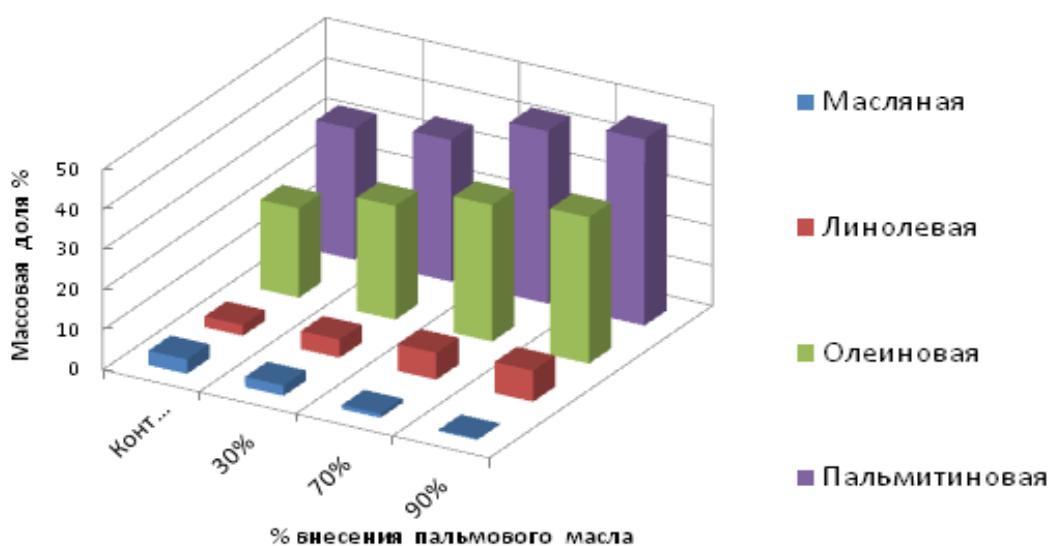


Рисунок 4 – Изменение содержания отдельных жирных кислот при замене молочного жира пальмовым маслом

Эксперимент показал, что именно эти кислоты начинают преобладать относительно массы других кислот, при этом снижается содержание короткоцепочечных кислот в том числе и масляной кислоты (C_{4:0}), являющейся специфической жирной кислотой молочного жира.

Полученные результаты исследования позволяют осуществлять

идентификацию пальмового масла в молочном жире по нарастанию пальмитиновой, олеиновой и линолевой жирных кислот преобладающих в его жирнокислотном составе наряду со снижением масляной кислоты. Так же стоит отметить, что содержания элаидиновой (транс-олеиновой) кислоты в чистом пальмовом масле близко к нулю, в то время как содержание той же кислоты в молочном жире варьируется в пределах 2-3%. Данную особенность так же необходимо учитывать при выявлении подмены молочного жира пальмовым маслом.

Также в ходе эксперимента для изучения ЖКС в образцах содержащих жиры немолочного происхождения применяли кокосовое масло. Полученные данные, представлены на рисунке 5.

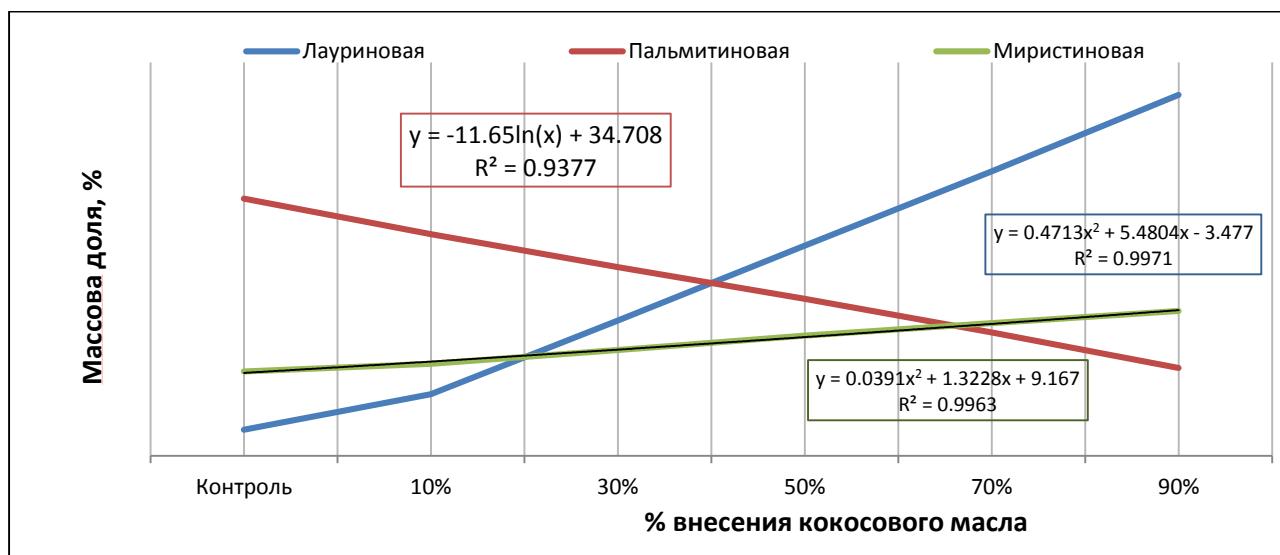


Рисунок – 5 Изменения состава жирных кислот под влиянием замены кокосовым маслом

Так как масло кокоса относится к лауриновой группе жиров, то основная доля жирных кислот по массе приходится на миристиновую (до 21%) и лауриновую (до 51%) жирные кислоты. Высокое содержание лауриновой кислоты в кокосовом масле относительно содержания той же жирной кислоты в молочном жире (3-4%) создает идеальные условия для проведения идентификации. Таким образом, даже незначительное добавление кокосового масла к молочному жиру на уровне 10% увеличивает содержание лауриновой кислоты почти в 3 раза, что является бесспорным критерием для обнаружения кокосового масла в молочном жире. Следует отметить, снижение уровня элаидиновой кислоты.

Для проведения эксперимента по оценке влияния говяжьего жира на ЖКС жировой фазы молока и молочных продуктов использовались модельные жировые системы. Данные эксперимента по оценке влияния говяжьего жира на ЖКС жировой фазы молока и молочных продуктов приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Изменения жирнокислотного состава молочного жира при внесении говяжьего жира

Наименование жирных кислот	Соотношение молочного жира и говяжьего жира, (n=10)						
	Молочный жир	90/10	70/30	50/50	30/70	10/90	Говяжий жир
Масляная, %	3,6±0,3	3,4±0,3	2,7±0,3	1,9±0,2	1,2±0,2	0,4±0,1	-
Лауриновая, %	3,3±0,5	2,9±0,5	2,2±0,5	1,6±0,4	1,1±0,4	0,4±0,3	0,1±0,2
Миристиновая, %	10,7±1,1	10,3±1,1	8,7±1,1	7,2±1,0	5,8±1,8	4,0±0,5	3,3±0,5
Пальмитиновая, %	32,6±1,8	30,9±1,8	29,0±1,8	28,5±1,8	27,6±1,7	26,8±1,7	26,0±1,7
Стеариновая, %	9,9±1,5	11,1±1,5	13,4±1,5	15,8±1,6	17,9±1,6	19,8±1,6	21,0±1,7
Элаидиновая, %	2,7±0,3	2,7±0,3	2,4±0,3	2,2±0,3	2,1±0,3	1,8±0,2	1,7±0,2
Олеиновая, %	22,3±1,5	23,7±1,5	25,0±1,5	28,2±1,5	30,1±1,6	34,6±1,6	35,5±1,6
Линолевая, %	2,6±0,4	2,9±0,4	2,6±0,4	2,3±0,4	2,1±0,4	1,7±0,3	1,7±0,3

Полученные данные показывают существенное отличие изменения состава жирных кислот молочного жира при замене жирами животного происхождения в отличие от жиров происхождения растительного. Отличительной особенностью говяжьего жира является высокое содержание олеиновой ($C_{18:1}Cis$) и стеариновой ($C_{18:0}$) кислот, при низком содержании короткоцепочечных кислот и полного отсутствия характерной для молочного жира масляной кислоты ($C_{4:0}$).

Фальсификацию молочных жиров в настоящее время условно можно поделить на «тонкую» до 20% и «грубую» более 20% замены молочного жира жирами растительного и животного происхождения. Если рассмотреть полученные экспериментальные данные по изменению состава жирных кислот при внесении других компонентов, то можно сделать вывод о том, что фальсификация на уровне 30% и выше этим методом гарантированно выявляется, а полученные данные позволяют идентифицировать примененные для замены жиры. Однако широкая вариативность состава жирных кислот молока совершенно не дает такой возможности при незначительной замене (менее 20%). При оценке полученных данных видно, что такая фальсификация трудно выявляема и находится в правовой зоне не позволяющей сделать достоверный вывод о подмене жиров молока и молочной продукции жирами иного происхождения (таблица 4).

Таблица 4 - Сравнительная оценка содержания жирных кислот в исследуемых образцах

Наименование жирных кислот	Молочный жир n=10	ГЖ-10% n=10	ПМ-10% n=10	ГЖ-30% n=10	ПМ-30% n=10	Нормы по ГОСТ 32261-2013
Масляная, %	3,62±0,3	3,44±0,3	3,31±0,3	2,67±0,3	2,57±0,3	2,4-4,2

продолжение таблицы 4

Лауриновая, %	3,32±0,5	2,86±0,5	3,25±0,5	2,25±0,5	2,21±0,5	2,0-4,4
Миристиновая, %	10,70±1,1	10,33±1,1	10,68±1,1	8,77±1,1	7,85±1,1	8,0-13,0
Пальмитиновая,%	32,69±1,8	30,98±1,8	33,08±1,8	29,02±1,8	34,73±1,8	21-35
Стеариновая,%	9,95±1,5	11,08±1,5	8,56±1,5	13,43±1,5	8,12±1,5	8-13,5
Элаидиновая, %	2,77±0,3	2,73±0,3	2,28±0,3	2,49±0,3	1,91±0,3	Не нормируется
Олеиновая,%	22,30±1,5	23,78±1,5	24,23±1,5	25,03±1,5	28,39±1,5	20-32
Линолевая, %	2,65±0,4	2,91±0,4	3,25±0,4	2,65±0,4	4,50±0,4	2,2-5,5

Результаты показывают, что определение жирнокислотного состава, не достаточно для получения полноценной информации о составе жировой фазы молока и молочных продуктов.

В разделе 3.4 приведены результаты исследований состава ТАГ для аутентификации молочного жира. Проведена экспериментальная работа по изменению состава ТАГ модельных жировых систем с внесением жиров растительного (пальмовое и кокосовое масло) и животного происхождения (говяжий жир).

Полученные экспериментальные данные показывают, что преобладающими группами ТАГ в пальмовом масле являются семейства C₄₈-C₅₄ (94 % от общей массы), тогда как ТАГ состава C₂₄-C₄₆ практически отсутствуют (6%). При этом молочный жир в своем составе имеет иное распределение триацилглицеридов. ТАГ короткой цепи C₂₄-C₃₄ составляют порядка 13-15%, средней C₃₆-C₄₄ около 50-54% и длинноцепочечные C₄₆-C₅₄ 33-35% в соотношении 1:5:4. В связи с этим маркерными ТАГ для выявления пальмового масла следует принять именно семейства триглицеридов с числом атомов углерода в цепи C₅₀-C₅₄.

Полученные экспериментальные данные показали преобладание в кокосовом масле групп триглицеридов состава C₃₂-C₄₀. При замене молочного жира кокосовым маслом в количестве менее 30%, состав ТАГ менее информативен, чем ЖКС. Поэтому применение метода определения состава жирных кислот для выявления фальсификации жирами лауриновой группы наиболее предпочтительно.

Изучение состава триацилглицеридов говяжьего жира показывает, что он во многом схож с составом ТАГ пальмового жира, также преобладающими группами триглицеридов являются семейства C₄₈-C₅₄, в то время как ТАГ состава C₂₄-C₄₆ в основном не выражен.

Оценка ТАГ пальмового и говяжьего жиров выявила различия в составе основных семейств C₅₀-C₅₂. Так пальмовый жир содержит на 30% большее количество группы C₅₀, на 35% меньше ТАГ состава C₅₄. Профиль различия в составе триацилглицеридов выражен на рисунке 6.

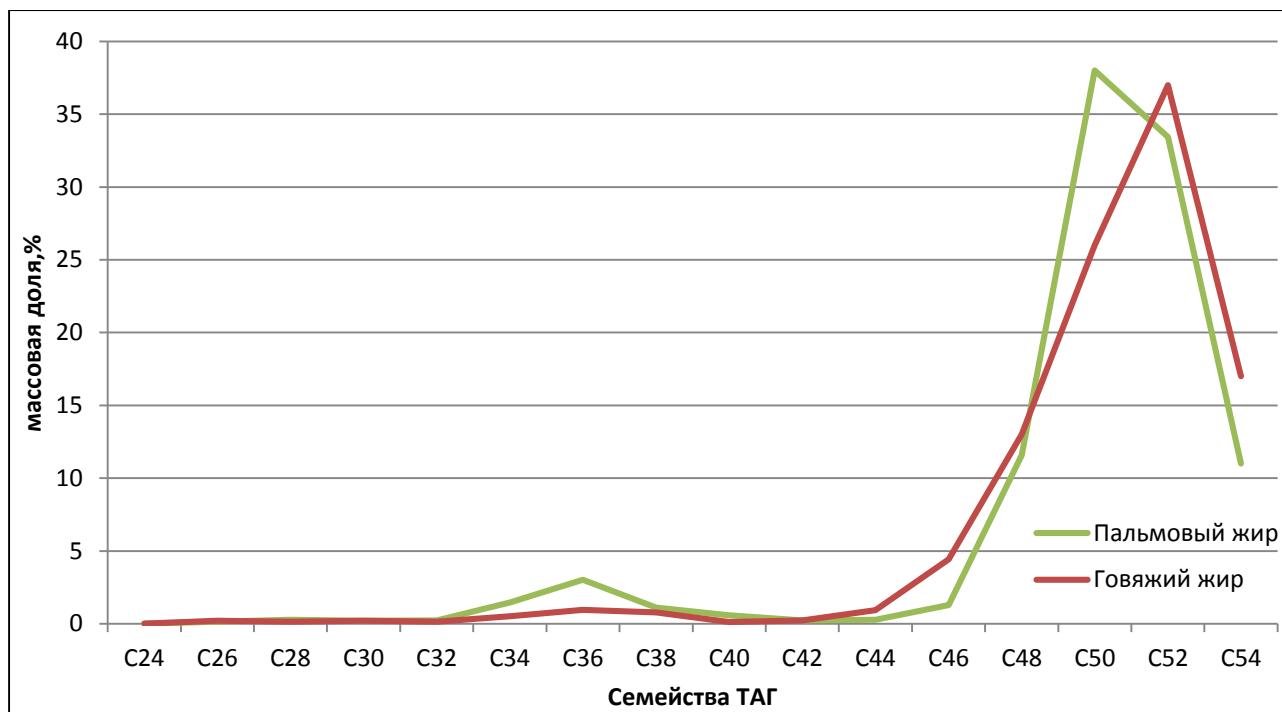


Рисунок 6 - Профиль триглицеридов пальмового масла и говяжьего жира

В разделе 3.5 приведены результаты исследований применения метода ВЭЖХ для анализа состава стеролов в жировой фазе молока и молочной продукции, что позволило сделать вывод об эффективности применения данной методики. Метода ВЭЖХ был использован для количественной оценки содержания холестерина, как критерия идентификации жиров не молочного происхождения в составе жировой фазы молока и молочной продукции (таблица 5).

Таблица 5 - Содержание холестерина в образцах содержащих жиры растительного и животного происхождения

Соотношение молочного жира с пальмовым маслом и говяжьим жиром, %	Содержание холестерина, мг/100г, (n=10)	
	Пальмовое масло	Говяжий жир
90/10	23,52±1,5	37,58±2,1
70/30	16,48±1,2	34,58±1,8
50/50	12,57±1,0	31,24±1,8
30/70	8,17±0,8	28,61±1,6
10/90	5,64±0,6	27,58±1,6
100	0,1±0,1	26,84±1,5

В ходе проведения эксперимента было установлено, что применение методик анализа состава стеролов жировой фазы молока и молочной продукции не позволяет проводить выявление жиров животного происхождения. Однако при комплексном анализе появляется возможность определения природы добавленного жира.

В 4 главе приведены результаты исследований по разработке системы аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции.

Разработанные модельные жировые системы позволили применить графический анализ состава ТАГ с внесенными в исследуемые образцы жиры растительного и животного происхождения (рисунок 7).

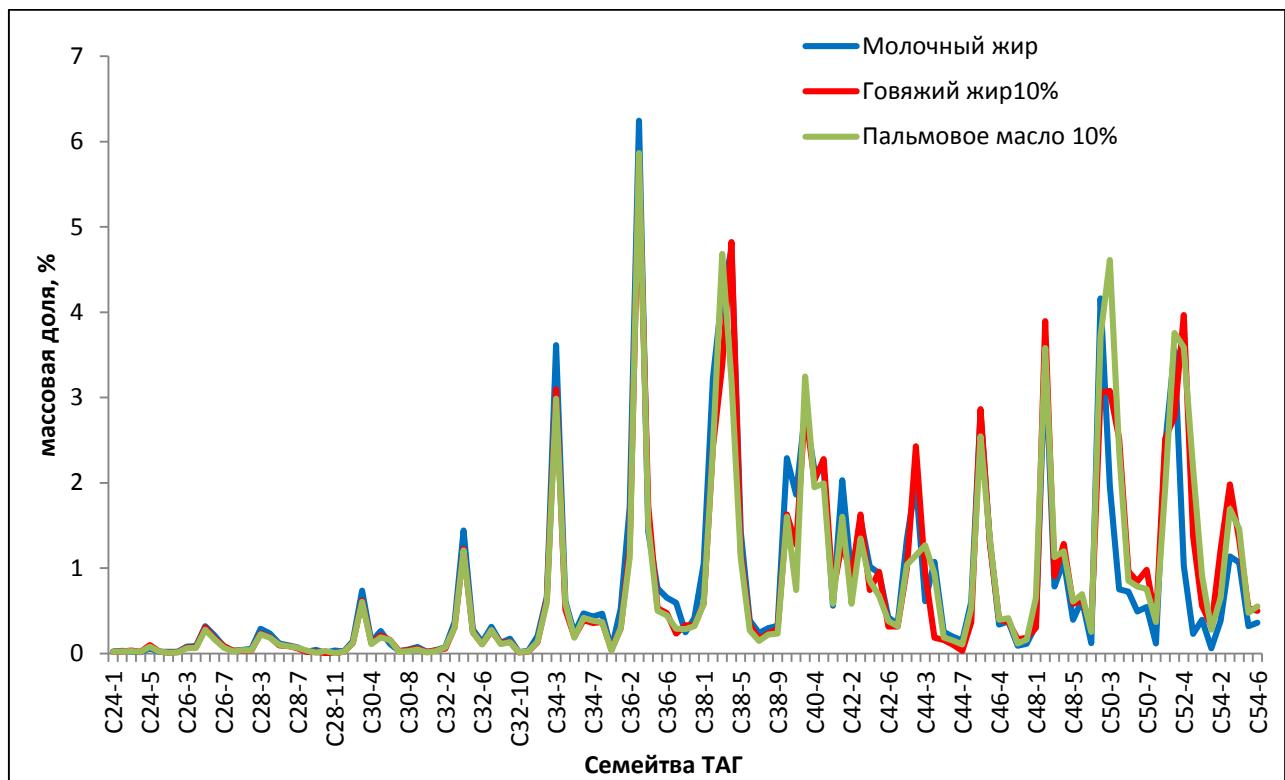


Рисунок 7 - Картирование триацилглицеридов состава C24-C54

Данные графического анализа показывают, что наиболее информативными для целей идентификации являются семейства триацилглицеридов состава C₄₄, C₅₀, C₅₂ и C₅₄. Это обусловлено не только различным содержанием этих семейств, но и различиями в структуре каждого триацилглицерида.

Применение графического анализа позволило объединять методики анализа жировой фазы в единую систему аутентификации молочного жира. Данные «идентификационных» точек, полученных в ходе анализа состава ТАГ, жирных кислот и стеролов можно преобразовывать в контрольные карты для аутентификации молочного жира по принципу «отпечатков пальцев». На рисунке 8 представлен результат анализа методом картирования с использованием идентификационных точек полученных с применением методов ГХ и ВЭЖХ.



Рисунок 8 - Результат графического анализа образцов сметаны с заменой жировой фазы и без замены

Графический анализ с применением контрольных карт позволяет проводить мониторинг изменения состава жировой фазы молока и молочной продукции для выявления жиров немолочного происхождения и определения их происхождения.

Для расчета массовой доли жиров немолочного происхождения в составе молочной продукции был проведен математический анализ модельных жировых систем с уровнями замещения 10, 30, 50, 70, 90 и 100% с применением пальмового и говяжьего жиров.

Для создания модели прогнозирования массовой доли жиров растительного и животного происхождения основанной на интеграции жирных кислот и триацилглицеридов использовался метод множественной линейной регрессии.

Согласно уравнению $(X^T X)^{-1} X^T Y(1)$ (где Y – уровни внесения, а X – концентрация «идентификационных» точек) были рассчитаны векторы оценок коэффициентов регрессии. На базе которых, были построены уравнения регрессии для расчета массовой доли жиров немолочного происхождения, внесенных в жировую фазу молока и молочной продукции.

Для жирнокислотного состава были использованы следующие показатели содержания жирных кислот: X_1 -масляная кислота; X_2 -лауриновая кислота; X_3 -миристиновая кислота; X_4 -пальмитиновая кислота; X_5 -стеариновая кислота; X_6 -элаидиновая кислота; X_7 -олеиновая кислота; X_8 -линолевая кислота

ПМ (ЖКС) = $-21,106-6,1525X_1-4,7504X_2-0,2831X_3+1,7019X_4-0,3317X_5-4,3154X_6+0,6426X_7+2,0055X_8$ (2)

ГЖ (ЖКС) = $-26,9145-9,2074X_1-4,9472X_2+0,4341X_3+0,04149X_4+2,207X_5-2,5936X_6+2,192X_7+1,9505X_8$ (3)

При сравнительной оценке влияния анализируемых факторов (X) на результативный признак (Y) было выявлено, что большее значение переменным регрессионной модели придают семейства триацилглицеридов: X_1 -C38; X_2 -C44;

X_3 -C48; X_4 -C50; X_5 -C52; X_6 -C54 (для говяжьего жира); X_1 -C36; X_2 -C38; X_3 -C40; X_4 -C48; X_5 -C50; X_6 -C52; X_7 -C54 (для пальмового масла).

$$\text{ГЖ (ТАГ)} = 2.0355 - 1.2193X_1 - 2.9015X_2 + 0.8284X_3 + 0.953X_4 + 1.7163X_5 - 0.08638X_6 \quad (4)$$

$$\text{ПМ (ТАГ)} = 73,124 - 1.6494X_1 - 3,8981X_2 - 0,184X_3 - 0,9987X_4 + 0,7329X_5 + 0,6357X_6 + 0,01135X_7 \quad (5)$$

Для оценки построенных уравнений регрессии были использованы параметры, отраженные в таблице 6.

Таблица 6 - Параметры уравнения для пальмового масла и говяжьего жира

Параметры уравнения множественной линейной регрессии	Модельные жировые системы			
	МЖ+ПЖ (ЖКС)	МЖ+ГЖ (ЖКС)	МЖ+ГЖ (ТАГ)	МЖ+ПЖ (ТАГ)
Ошибка аппроксимации, %	5,86	4,87	3,94	2,74
Оценка дисперсии	350,72	285,33	282,94	190,57
Среднеквадратичное отклонение, %	2,39	2,16	2,08	1,75
Коэффициент множественной корреляции, R	0,997	0,998	0,998	0,999
F-статистика.Критерий Фишера.	0,996	0,997	0,997	0,998
Вариабельность Y от X, %	99,61	99,68	99,70	99,79

Расчёт массовой доли жиров немолочного происхождения согласно регрессионной модели позволили сделать вывод, что можно использовать расчётные значения как по жирнокислотному составу, так и по составу ТАГ. Поскольку прямая и обратная зависимость состава ЖКС и ТАГ не установлена, применить общую модель множественной линейной регрессии не представляется возможным. В связи с этим целесообразно применять расчет количества внесенных жиров как растительного, так и животного происхождения по наборам «идентификаторов» жирнокислотного и триацилглицеридного составов. А, в качестве итоговой оценки состава жировой фазы применять среднее значение расчета.

Рассмотренные варианты аутентификации молочного жира позволяют разработать алгоритм аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции с применением современных аналитических методов газовой и жидкостной хроматографии.

С учетом обоснованных точек контроля жировой фазы, на основании полученных хроматографических данных, разработан алгоритм управления контрольными методами по анализу жировой фракции молока (рисунок 9).



Рисунок 9 – Алгоритм аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции

В главе 5 приведены результаты исследований по разработке методик измерений ЖКС, ТАГ и состава стеринов.

В разделе 5.1 приведены результаты по разработке способа экстракции жировой фазы из молока и молочной продукции. Для определения оптимального экстрагента была проведена сравнительная характеристика используемых методов выделения жира (рисунок 10).

Экспериментально доказано, что максимальная продуктивность экстракции обеспечивается посредством применения неполярного растворителя гексана. Предложен вариант механического воздействия на анализируемый объект, который в комплексе с применением гексана обеспечивает следующие показатели:

- Минимальный расход образца (не более 50г);
- Снижение расхода экстрагента (возможность многократного применения растворителя с потерей при отгонке не более 2%);
- Время экстракции от 30 секунд до 1 минуты;
- Подходит для всех объектов исследований.



Рисунок 10 – Методы экстракции жировой фракции молока и молочной продукции

В разделе 5.2 приведена разработка методики «быстрой» газовой хроматографии для анализа состава жирных кислот в жировой фазе молока и молочных продуктах. Для подтверждения метрологических характеристик разработанной методики были проведены сличительные испытания с общепринятой методикой определения ЖКС.

Для разработанной методики было изучено влияние программирования температуры, а так же подобран оптимальный режим хроматографирования. Проведена оценка разработанного аналитического метода по показателю повторяемости времени удержания, которые составили 0,2%. Также была изучена сопоставимость количественных данных измерения жирнокислотного состава. Погрешность измерений между двумя способами измерений составила не более 2,5%. Время анализа сложного состава жирных кислот составило 49,07 минуты для классического метода определения и 8,44 минуты для метода «быстрой» хроматографии.

Разработанная методика измерений отвечает требованиям, предъявляемым к хроматографическим методикам. Методика «быстрой» ГХ и может быть эффективно использована для анализа жирнокислотного состава жировой фазы молока и молочных продуктов, особенно в условиях производственных лабораторий.

В разделе 5.3 приведена разработка и валидация методики определения состава стеролов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определена методика пробоподготовки образцов молока и молочной продукции. Изучены аналитические характеристики методики:

Специфичность – экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов не влияет на результат анализа.

Линейность - для оценки линейности анализировали образцы аналитических стандартов. Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. Коэффициент корреляции для всех компонентов составил 0,99.

Правильность - Анализ правильности оценивали по критерию открываемости определяемого вещества R, который вычисляли по формуле: $R = (\text{обнаружено аналита} / \text{внесено аналита}) * 100$. Относительное стандартное отклонение RSD, % для данного показателя составило 1,02%.

Повторяемость методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории в течение короткого промежутка времени. Относительное стандартное отклонение не превысило 2,0%, что отвечает требованиям к методикам высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Разработанная методика была апробирована на лабораторных и промышленных образцах, отклонение результатов, полученных с использованием разработанной методики, от фактических значений не превышает 5%.

Полученные результаты подтверждают возможность применения методики для контроля содержания стеролов в составе жировой фазы молока и молочной продукции.

Для оценки состава ТАГ молока и молочной продукции была разработана методика газохроматографического определения. В разделе 5.4 приведены результаты валидации методики. Оценку аналитических характеристик проводили по показателям повторяемости и стабильности. Результаты повторяемости приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты оценки повторяемости методики ($n=10$, $p<0,95$)

Семейства триацилглицеридов	Среднее значение X	Стандартное отклонение SD, %	Относительное стандартное отклонение RSD, %	Доверительный интервал среднего значения
C ₂₄	0,171	0,003	1,76	0,16-0,17
C ₂₆	0,815	0,015	1,91	0,80-0,82

C ₂₈	1,07	0,020	1,88	0,93-1,21
C ₃₀	1,65	0,025	1,51	1,63-1,67
C ₃₂	3,06	0,033	1,08	3,04-3,08
C ₃₄	6,63	0,096	1,45	6,58-6,68
C ₃₆	12,33	0,136	1,10	12,22-12,44
C ₃₈	14,66	0,228	1,56	14,57-14,75
C ₄₀	13,03	0,28	1,98	12,90-13,16
C ₄₂	12,3	0,192	1,56	12,22-12,38
C ₄₄	4,87	0,074	1,53	4,82-4,92
C ₄₆	5,25	0,089	1,69	5,18-5,32
C ₄₈	7,79	0,125	1,84	7,72-7,86
C ₅₀	8,68	0,138	1,59	8,59-8,77
C ₅₂	7,76	0,142	1,83	7,67-7,85
C ₅₄	3,67	0,072	1,96	3,63-3,71

Относительное стандартное отклонение RSD, % не превышает 2%, что говорит о пригодности хроматографической методики.

Оценку стабильности определяли на образцах молочного жира. Образцы в растворенном виде были помещены в различные условия хранения в течение 72 ч:

- При комнатной температуре ($20\pm2^{\circ}\text{C}$);
- морозильная камера (минус 18-24°C);
- холодильная камера ($3\text{-}6^{\circ}\text{C}$).

При изучении стабильности было выявлено, что отклонения полученных значений концентраций варьируется в пределах от 0,29 до 2,31% и соответствуют требованиям к хроматографическим методикам (не более 10%).

В ходе выполнения работы разработана методика измерений состава ТАГ молока и молочной продукции. Пригодность методики измерений подтверждена валидационными характеристиками, что позволило включить ее в разрабатываемый государственный стандарт «Молоко и молочные продукты. Определения массой доли молочного жира».

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. Теоретически обоснована необходимость разработки алгоритма комплексной оценки жировой фазы молока и молочной продукции для аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции;
2. Набранный массив статистических данных по определению жирнокислотного и триглицеридного состава жировой фазы молока сырого позволил установить диапазоны содержания жирных кислот и триглицеридного состава с учетом региональных и сезонных особенностей. Установлены различия содержания ряда жирных кислот от установленных норм, в частности для пальмитиновой жирной кислоты (фактическое значение содержания составляет 28-30%), фактическое

содержание олеиновой жирно кислоты было определено в 22,0- 24,0%, тогда согласно нормированию допускается значение 32%;

3. Выявлено, что наибольшим изменениям содержания подвержены масляная ($C_{4:0}$) и линолевая ($C_{18:2}$) жирные кислоты как в процессе сквашивания, так и при термическом воздействии. Отмечено снижение содержание данных жирных кислот до 20-27% от начальной концентрации;
4. На модельных жировых системах установлена зависимость изменений триацилглицеридного и жирнокислотного состава при внесении в различных соотношениях жиров немолочного происхождения. Определены контрольные точки идентификации жиров растительного и животного происхождения с применением метода газовой хроматографии. Разработаны формулы расчета массовой доли жиров немолочного происхождения в составе жировой фазы молока и молочной продукции по жирнокислотному составу и составу триацилглицеридов;
5. Установлены идентификационные показатели жирнокислотного и триглицеридного состава жировой фазы молока, на основе которых разработан алгоритм комплексной оценки жировой фазы молока и молочных продуктов;
6. Разработаны методики измерений оценки жировой фазы молока и молочных продуктов с применением метода газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. На основе разработанных методик измерений осуществлена последующая их стандартизация: ГОСТ 32915-2014 «Молоко и молочная продукция. Определение жирнокислотного состава жировой фазы методом газовой хроматографии»; ГОСТ 34456-2018 «Определение состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»; Проект ГОСТ Р «Молоко и молочная продукция. Идентификация жировой фазы молока». Разработана методика измерений с применением метода «быстрой» газовой хроматографии для анализа состава жирных кислот в жировой фазе молока и молочной продукции.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации:

1. Добриян, Е.И. Функциональные молочные продукты, обогащенные ПНЖК семейства омега – 3 и омега 6 / Е.И. Добриян, Е.А. Юрова, **Н.А. Жижин** // Молочная промышленность. – 2013. - №11. - С. 45-46.
2. Юрова, Е.А. Оценка жировой фазы молочной продукции. Влияние технологических факторов и времени хранения на жирнокислотный состав / Е.А. Юрова, **Н.А. Жижин** // Молочная промышленность.- 2016. -№12. - С. 36-38.
3. Юрова, Е.А. Фальсификация жировой фазы молочных продуктов. Методики выявления животных жиров // Е.А. Юрова, **Н.А. Жижин** // Молочная промышленность. - 2017. - №11. - С. 33-36.

4. Объективная оценка заданных свойств продукта / Е.А. Юрова, Е.Ю. Денисович, Т.В. Кобзева, Д.Н. Мельденберг, Е.С. Семенова, **Н.А. Жижин** и др. // Молочная промышленность. – 2019. - №10. - С. 40-42.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:

1. **Жижин Н.А.** Исследование жирнокислотного состава жировой фазы молока-сырья и продуктов его переработки / Н.А. Жижин, Е.А. Юрова // Сборник научных трудов VII конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских институтов: тез. конф., Отделения хранения и переработки сельскохозяйственной продукции Россельхозакадемии / Россельхозакадемия. – Москва, 2013. - С. 142-148.
2. Влияние растительно-зерновых ингредиентов на жирнокислотный состав десерта молочного / Г.А. Донская, В.М. Дрожжин, В.А. Асафов, Е.А. Юрова, **Н.А. Жижин** // Пищевые инновации и биотехнологии: материалы междунар. науч. конф. / ФБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»; под общ. ред. А.Ю. Просекова. - Кемерово, 2015. - С. 73-75.
3. **Жижин Н.А.** Разработка метода оценки состава жировой фазы молока по соотношению стеринов / Н.А. Жижин, Е.А. Юрова, О.С. Полякова // Научное обеспечение молочной промышленности микробиология, биотехнология, технология, контроль качества и безопасности: Сб. науч. трудов / Учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (ФГБНУ «ВНИМИ»). - Москва: Франтера, 2015. - С. 49-54.
4. Юрова Е.А. Применение современных высокоеффективных методов анализа для оценки качества и безопасности молочной сыворотки / Е.А. Юрова, Д.Н. Мендельберг, **Н.А. Жижин** // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела материалы Международной научно-практической конф. / Северо-Кавказский федеральный университет. - Ставрополь, 2015. – С. 430-433.
5. **Жижин Н.А.** Разработка новых подходов к определению жирнокислотного состава молока и молочных продуктов с применением метода газовой хроматографии / Н.А. Жижин // Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук / Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. - Москва, 2016. - С. 94-98.
6. **Жижин Н.А.** Применение метода высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для оценки составных частей молока и молочных продуктов / Н.А. Жижин, Е.А. Юрова // Пища. Экология. Качество. Труды XIII международной научно-практической конф. / Красноярский государственный аграрный университет. - Красноярск, 2016. – С. 399-404.
7. Канина К.А. К вопросу о физико-химических показателях козьего, овечьего и коровьего молока / К.А. Канина, Т.О. Робкова, **Н.А. Жижин** // Международная научно-практическая конф., посвященная памяти Василия

Матвеевича Горбатова / Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. - Москва, 2017. – С. 145-146.

8. Юрова Е.А. Выявление фальсификации жировой фазы молочной продукции / Е.А. Юрова, Т.В. Кобзева, **Н.А. Жижин** // Контроль качества продукции. – 2018. – №1. – С. 34-39.

9. Юрова Е.А. Особенность применение методов контроля показателей качества и безопасности молочной продукции / Е.А. Юрова, **Н.А. Жижин**, Е.Ю. Денисович // Переработка молока. - 2019. - №5. - С. 6-9.

Список сокращений и условных обозначений

ЖКС - жирнокислотный состав;

ТАГ – триацилглицерины;

МЖ - молочный жир;

ЖНМП - жиры немолочного происхождения;

ГХ - газовая хроматография;

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГЖ - говяжий жир;

ПМ – пальмовое масло.