

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и  
безопасности пищи**

*На правах рукописи*



**СОБОЛЕВ РОМАН ВЛАДИМИРОВИЧ**

**РАЗРАБОТКА ПИЩЕВЫХ ОЛЕОГЕЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ФРАКЦИЙ ПЧЕЛИНОГО ВОСКА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЖИРОВЫХ  
ПРОДУКТОВ**

Специальность 4.3.3 – Пищевые системы

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель:  
член-корреспондент РАН,  
доктор технических наук, профессор  
Кочеткова Алла Алексеевна

Москва, 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....</b>	<b>14</b>
1.1. Роль жиров и жирных кислот при производстве пищевых продуктов .....	14
1.2. Последствия избыточного потребления насыщенных и транс-изомерных жирных кислот.....	15
1.3. Альтернативы процесса гидрогенизации .....	17
1.4. Новый подход к структурированию жидких масел .....	18
1.5. Природные воски как гелеобразователи жидких масел .....	21
1.6. Существующие подходы к фракционированию восков.....	23
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>	<b>25</b>
<b>ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ: СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>25</b>
2.1. Схема проведения исследований.....	25
2.2. Характеристика используемых материалов и реактивов.....	27
2.3. Методы исследования компонентного состава гелеобразователей.....	28
2.4. Определение содержания общих полярных компонентов в маслах.....	30
2.5. Идентификация жирнокислотного состава масел и олеогелей .....	30
2.6. Подход к определению маслосвязывающей способности олеогелей.....	30
2.7. Методы определения гигиенических показателей олеогелей .....	31
2.8. Ускоренный метод определения окислительной стабильности олеогелей... 31	31
2.9. Методы определения витаминов D <sub>3</sub> и K <sub>2</sub> в составе олеогелей .....	32
2.10. Определение морфологических особенностей кристаллов в гелеобразователях и олеогелях .....	32
2.11. Метод определения текстурных характеристик гелеобразователей, олеогелей и спредов .....	33
2.12. Определение термических характеристик гелеобразователей, олеогелей и спредов.....	34
2.13. Метод органолептического анализа спредов .....	35
2.14. Подход к определению цветовых характеристик спредов.....	35

2.15. Методы статистической обработки экспериментальных данных.....	35
<b>ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СТРУКТУРИРОВАНИЯ ЖИДКИХ ПИЩЕВЫХ МАСЕЛ ПЧЕЛИНЫМ ВОСКОМ.....</b>	<b>36</b>
3.1. Определение жирнокислотного состава масел .....	37
3.2. Технология приготовления олеогелей и обоснование выбора .....	39
3.3. Изучение технологических характеристик олеогелей .....	41
3.3.1 Изучение микроструктурных особенностей.....	41
3.3.2 Определение маслосвязывающей способности .....	44
3.3.3. Определение текстурных свойств .....	46
3.3.4 ИК-спектроскопия с преобразование Фурье .....	48
3.3.5. Исследование термических характеристик .....	51
3.4. Корреляционный анализ .....	53
<b>ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ПЧЕЛИНОГО ВОСКА, АНАЛИЗ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ФРАКЦИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ГЕЛЕОБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ.....</b>	<b>57</b>
4.1 Разработка метода фракционирования пчелиного воска .....	58
4.2. Характеристика фракций пчелиного воска .....	61
4.2.1. Внешний вид.....	61
4.2.2 Идентификация компонентного состава.....	62
4.2.3. Определение характерных ароматических соединений.....	65
4.2.4 Морфология кристаллов .....	67
4.2.5 Термический анализ .....	68
4.3 Изучение отдельных фракций пчелиного воска в качестве гелеобразователей олеогелей .....	72
4.3.1 Изучение морфологии кристаллов олеогелей .....	72
4.3.2 Определение текстурных свойств олеогелей .....	73
<b>ГЛАВА 5. ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАКЦИЙ В РЕГУЛИРОВАНИИ СВОЙСТВ ОЛЕОГЕЛЕЙ.....</b>	<b>76</b>
5.1. Модификация процесса фракционирования .....	77

5.2. Идентификация компонентного состава фракций.....	79
5.3 Дизайн эксперимента.....	81
5.4. Изучение свойств олеогелей.....	83
5.4.1 Анализ микроструктуры.....	83
5.4.2. Определение маслосвязывающей способности.....	86
5.4.3. Построение качественной фазовой диаграммы.....	87
5.4.4. Термический анализ.....	89
5.4.5 Определение текстурных свойств.....	92
5.5. Корреляционный анализ.....	94
<b>ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЧЕЛИНОГО ВОСКА И КОМБИНАЦИЙ ЕГО ФРАКЦИЙ НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ПИЩЕВЫХ ОЛЕОГЕЛЕЙ.....</b>	<b>99</b>
6.1. Дизайн эксперимента.....	102
6.2. Анализ жирнокислотного состава масла и олеогелей.....	103
6.3. Определение устойчивости олеогелей к окислению.....	105
6.4. Характеристика летучих органических соединений.....	109
6.5. Определение периода индукции.....	112
6.6. Определение поведения текстурных свойств олеогелей при хранении.....	114
6.7. Корреляционный анализ.....	117
<b>ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ D<sub>3</sub> И K<sub>2</sub> НА СВОЙСТВА ОЛЕОГЕЛЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СОХРАННОСТИ.....</b>	<b>121</b>
7.1. Изучение влияния витаминов D <sub>3</sub> и K <sub>2</sub> на процесс гелеобразования.....	122
7.1.1. Визуальная оценка.....	123
7.1.2. Анализ микроструктуры.....	124
7.1.3. Определение маслосвязывающей способности.....	125
7.1.4. Определение текстурных свойств.....	126
7.2. Изучение сохранности витаминов D <sub>3</sub> и K <sub>2</sub> при хранении в составе олеогелей.....	129

<b>ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА ЖИРОВОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОЛЕОГЕЛЯ, СТРУКТУРИРОВАННОГО ВОСКОВЫМИ КОМПОНЕНТАМИ.....</b>	<b>132</b>
8.1 Исследование жирнокислотного состава липидных систем .....	134
8.2 Изучение текстурных свойств липидных систем .....	135
8.3. Технология выработки жирового продукта.....	136
8.4. Сравнение жирнокислотного состава спредов.....	140
8.5. Анализ свойств жирового продукта .....	141
8.5.1. Визуальная оценка.....	141
8.5.2. Оценка цвета .....	142
8.5.3. Оценка текстурных свойств .....	144
8.5.4. Определение термических свойств .....	146
8.5.5. Органолептический анализ.....	148
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>155</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>157</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>158</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>177</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний является чрезмерное потребление твердых жиров, содержащих насыщенные и транс-изомерные жирные кислоты, однако именно насыщенные жиры влияют на органолептические и реологические свойства продуктов. В связи с этим поиск альтернативы твердым жирам, обладающей схожими свойствами, но отличающейся отсутствием в составе транс-изомерных жирных кислот и сниженным содержанием насыщенных жиров является актуальной задачей.

В настоящее время технологией, наиболее близко подошедшей к решению данной проблемы, является использование олеогелей. Олеогели (органогели, структурированные пищевые масла) – это твердые дисперсные системы, дисперсионной средой которых являются жидкие пищевые масла, а дисперсной фазой – низко-или высокомолекулярные соединения, образующие постоянную однородную структуру [1]. Среди множества потенциальных гелеобразователей, наиболее подходящими для достижения целей работы являются воски, отдельные фракции которых способны проявлять различную структурирующую способность. Воски активно изучаются как гелеобразователи применяемых для производства структурированных жировых продуктов, таких как шортенинги и маргарины, в том числе целевого назначения, например для кондитерской промышленности [1]. Согласно [2] воски имеют существенные различия по фракционному составу, при этом корреляционный анализ между химическим составом восков и их гелеобразующими свойствами показал, что углеводороды и жирные кислоты играют ключевую роль в консистенции и стабильности олеогелей на основе воска. Более того, было показано, что восковые эфиры приводят к образованию прочного, но хрупкого олеогеля. Тем не менее, выбор восков одобренных к применению в пищевой промышленности ограничен. В этом случае может оказаться полезным извлечение различных восковых компонентов из разрешенных восков и поиск их оптимального состава для гелеобразования.

Как показано [2] пчелиный воск содержит все основные группы потенциальных гелеобразователей (углеводороды, восковые эфиры, свободные жирные кислоты и спирты) и согласно ТР ТС разрешен не только как глазирователь, но и как носитель. Учитывая, что путем комбинирования различными восками можно достигать улучшения функционально-технологических свойств [3], можно предположить, что и комбинирование отдельными фракциями позволит достичь оптимальных характеристик олеогеля. Так как пчелиный воск обладает одним из наиболее разнообразных фракционных составов и разрешен к применению в пищевой промышленности - это делает его основным претендентом на фракционирование для использования полученных компонентов в качестве гелеобразователей жидких пищевых масел.

**Степень разработанности темы исследования.** В теорию и практику различных аспектов структурирования жидких растительных масел для получения липидных систем твердой консистенции и их дальнейшего использования в составе пищевых продуктов внесли вклад такие учёные как А.П. Нечаев, А.А. Кочеткова, Л.В. Зайцева, В.А. Саркисян, Ю.В. Фролова, Н.В. Неповинных, В.С. Куценкова, A.G. Marangoni, M. Davidovich-Pinhas, C.D. Doan, E. Yilmaz, J. K. Winkler-Moser, M.A. Rogers, J. F. Toro-Vazquez, A.R. Patel, H.S. Hwang, A.J. Martins, E. Flöter и др.

**Цели и задачи работы.** Целью данной работы являлись разработка пищевых олеогелей, структурированных низкомолекулярными соединениями, полученными фракционированием пчелиного воска, и комплексное исследование их свойств для реализации технологии жировых продуктов.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

- систематизировать научные данные в области исследования олеогелей;
- изучить гелеобразующие свойства нативного пчелиного воска в жидких маслах с различным жирнокислотным составом;
- разработать методику фракционирования пчелиного воска для изучения роли его отдельных фракций в гелеобразовании;

- выявить взаимосвязи между фракционным составом пчелиного воска и его гелеобразующими свойствами;
- изучить влияние пчелиного воска и комбинаций его фракций на окислительную стабильность пищевых олеогелей;
- изучить устойчивость витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> в составе олеогелей с целью оценки возможности использования олеогелей в качестве носителя биологически активных веществ;
- разработать пищевой жировой продукт в виде спреда с заменой твердого жира на олеогель.

**Научная новизна** заключается в следующем:

- впервые разработана методика фракционирования пчелиного воска методом препаративной флеш-хроматографии с помощью растворителей, разрешенных для применения в пищевой промышленности;
- определено влияние жирнокислотного состава масел, структурируемых пчелиным воском, на функционально-технологические свойства образуемых олеогелей; показана возможность формирования твердой консистенции липидной системы при содержании полиненасыщенных жирных кислот до 70%;
- выявлены статистические взаимосвязи между фракционным составом пчелиного воска и его гелеобразующими свойствами;
- впервые оценена окислительная стабильность олеогелей, структурированных комбинациями фракций пчелиного воска, в условиях хранения при температурах выше и ниже точки их плавления;
- показана возможность использования олеогеля в качестве носителя жирорастворимых витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>, что обеспечивает повышение их стабильности до 20% в процессах получения и хранения пищевого олеогеля относительно неструктурированного масла;
- на примере растительно-жирового спреда показана принципиальная возможность замены до 50% твердого жира на олеогель, структурированный восковыми компонентами при обеспечении приемлемых характеристик.

### **Теоретическая и практическая значимость работы:**

– предложен способ структурирования жидких растительных масел для получения жировых продуктов с текстурными и органолептическими характеристиками, аналогичными продуктам на основе традиционных жиров твердой консистенции, и обеспечивающих возможность замены в пищевых технологиях жировых продуктов, содержащих насыщенные и транс-изомерные жирные кислоты;

– методом фракционирования пчелиного воска с использованием препаративной жидкостной флеш-хроматографии впервые получены отдельные фракции пчелиного воска для создания эффективных гелеобразователей жидких растительных масел; получены новые гелеобразователи жидких растительных масел в виде комбинаций отдельных фракций пчелиного воска;

– определен химический состав пчелиного воска и его фракций, изучены их микроструктурные и термические характеристики в качестве исходных данных для создания эффективных липофильных гелеобразователей;

– разработана техническая документация в виде технических условий ТУ 10.42.10-014-0897222-2023 на олеогель и технологическая инструкция ТИ 10.42.10-014-0897222-2023 по его изготовлению с использованием структурообразователя восковой природы, что обеспечивает условия для внедрения в производство;

– разработаны рецептура и технология нового жирового продукта в виде растительно-жирового спреда, представляющего собой эмульсионный олеогель, структурированный восковыми компонентами;

– разработаны и утверждены в установленном порядке технические условия ТУ 10.42.10-015-0897222-2023 на спред растительно-жировой с использованием олеогеля и технологическая инструкция ТИ 10.42.10-015-0897222-2023 по изготовлению растительно-жирового спреда с использованием олеогеля, что обеспечивает условия для внедрения разработанного жирового продукта в производство;

– наработана опытная партия олеогеля на основе подсолнечного масла, структурированного пчелиным воском (концентрация 3,0%); результат выработки опытной партии оформлен актом;

– осуществлена промышленная апробация разработанных рецептуры и технологии растительно-жирового спреда в производственных условиях ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты» (г. Алексеевка); по результатам апробации составлен акт внедрения результатов научно-исследовательских и технологических работ.

**Методология и методы исследования.** Объектами исследований являлись: подсолнечное масло, льняное масло, оливковое масло, рыбий жир, пчелиный воск, его отдельные фракции и их комбинации, олеогели, структурированные этими компонентами, витамины D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>, заменитель молочного жира, а также растительно-жировые спреды.

В основе методологии диссертационной работы лежат труды российских и зарубежных ученых, посвящённые изучению подходов к структурированию жидких пищевых масел путем добавления низкомолекулярных гелеобразователей.

В работе применялись современные методы: препаративная жидкостная флеш-хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, тонкослойная хроматография, ИК - спектроскопия с преобразованием Фурье, дифференциально-сканирующая калориметрия, метод исследования текстурных свойств с использованием универсальной испытательной машины, титриметрический и ускоренный методы определения устойчивости к окислению, световая микроскопия с поляризацией, с дифференциально-интерференционным контрастом, а также методы математической статистики для обработки полученных результатов.

**Научные положения, выносимые на защиту:**

созданы новые жировые продукты (олеогели), представляющие собой жидкие пищевые масла, структурированные с использованием различных гелеобразователей для придания разной консистенции;

– показана возможность применения для фракционирования пчелиного воска препаративной флеш-хроматографии с использованием гексана и ацетона в качестве элюентов;

– путем фракционирования пчелиного воска и последующим комбинированием выделенных фракций могут быть получены эффективные гелеобразователи для разработки олеогелей с улучшенными функционально - технологическими свойствами;

– олеогели являются эффективным носителем жирорастворимых витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>, повышающим их устойчивость к окислению;

– использование олеогелей позволяет получать пищевые продукты с традиционными потребительскими характеристиками при пониженном содержании твердых жиров, замещенных на олеогель.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.**

Диссертация соответствует пунктам 7, 8, 15 и 30 паспорта специальности ВАК РФ (технические науки) 4.3.3 – «Пищевые системы».

**Личный вклад соискателя.** Диссертационная работа является обобщением научных исследований, проведенных в 2019-2022 гг. автором лично и при его непосредственном участии в качестве исполнителя гранта РФФИ (проект №19-16-00113 «Изучение кристаллизационных свойств отдельных фракций пчелиного воска и их комбинаций для разработки пищевых олеогелей с заданными составом и свойствами).

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов подтверждена применением современных методов анализа и промышленной апробацией. Статистическая обработка данных и их

визуализация осуществлялась при помощи пакета программ Statistica 10 (StatSoft Inc, США) и OriginPro 2018 (Origin, Великобритания). Эксперименты проводили в трех-пятикратной повторности. Уровень значимости составлял ( $p < 0,05$ ) с уровнем достоверности 95%.

Результаты исследований доложены и обсуждены на следующих научных мероприятиях: II Школе молодых ученых с международным участием «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» (Москва, 2019); Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020); Ежегодном международном заседании American Oil Chemists' Society (AOCS) Annual Meeting & Expo (США, 2021); III Национальной научно-практической конференции «Пищевые ингредиенты и биологически активные добавки в технологиях продуктов питания и парфюмерно-косметических средств» (Москва, 2021); VI Форуме «Наука будущего - Наука молодых» (Москва, 2021); Международной конференции Food BioTech 2021 (Санкт-Петербург, 2021); Ежегодном международном заседании American Oil Chemists' Society (AOCS) Annual Meeting & Expo (США, 2022); VIII Международной научно-практической конференции «Церевитиновские чтения» (Москва, 2022); VII Форуме «Наука будущего - Наука молодых» (Новосибирск, 2022); IX Международной научно-практической конференции «Церевитиновские чтения» (Москва, 2023); XVIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Нутрициология и диетология для здоровьесбережения населения России» (Москва, 2023).

Результаты работы отмечены дипломом победителя III степени конкурса научно-исследовательских работ студентов и аспирантов российских вузов в рамках VI Форума «Наука будущего - Наука молодых», секции Агро-, био- и продовольственные технологии (Москва, 2021);

Результаты работы включены в число финалистов конкурса научно-исследовательских работ студентов и аспирантов российских вузов в рамках VII Форума «Наука будущего - Наука молодых», секции Агро-, био- и продовольственные технологии (Новосибирск, 2022).

Результаты работы включены в тройку финалистов конкурса Student e-Poster Pitch Competition, Lipid Oxidation and Quality Division, AOCS Annual Meeting & Expo 2022 (США, 2022).

**Публикации.** По результатам исследований, представленных в диссертации, опубликованы 30 печатных работ, из них 15 статей - в научных журналах, рецензируемых в базах данных Scopus, Web of Science и рекомендованных ВАК.

**Место выполнения работы.** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия).

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 200 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 45 рисунков. Состоит из оглавления, введения, аналитического обзора литературы, экспериментальной части из 7 глав, выводов, списка использованной литературы и приложений. Список литературы включает 178 источников российских и зарубежных авторов.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Роль жиров и жирных кислот при производстве пищевых продуктов

При производстве продуктов питания широко распространено применение масел и жиров, что является следствием их особенных свойств. Эти компоненты обеспечивают необходимую консистенцию, текстуру и вкусовые характеристики пищевых продуктов. Масла и жиры являются важными компонентами пищи в силу того, что представляют собой источник энергетического и пластического материала для человека, содержат необходимые ненасыщенные жирные кислоты, фосфолипиды, жирорастворимые витамины и т.д. Жиры и масла обычно выступают в качестве носителей вкусоароматических веществ [4,5].

Жиры состоят из молекул триацилглицерина, обычно обозначаемых как ТАГ. Химически ТАГ состоят из глицерина, к которому присоединены три цепи жирных кислот. Жирные кислоты, как основные структурные элементы триглицеридов, значительно различаются по длине углеродной цепи, числу и положению в ней двойных связей, пространственной конфигурацией, что обуславливает их физические, химические и биологические свойства [6]. Согласно [7] длина цепи жирной кислоты и степень насыщения (или ненасыщенности) определяют физические свойства жира. Как правило, чем длиннее цепь жирной кислоты или чем выше уровень насыщения, тем выше температура плавления жира. Такие жиры имеют тенденцию быть твердыми при комнатной температуре, тогда как ТАГ с более короткими цепями или более высокой степенью ненасыщенности имеют тенденцию быть жидкими при комнатной температуре, что объясняет принципиальное различие между жирами и маслами. Содержание твердых веществ, размер и распределение кристаллов в сетке определяют химическое и физическое поведение жира [8]. В пищевой промышленности большим спросом пользуются жиры разной степени твердости в зависимости от используемого типа пищевого продукта. Так, например твердые

насыщенные жиры широко используются в производстве кулинарных шортенингов, маргаринов и кондитерских изделий благодаря своей функциональности и органолептическим свойствам, которые они придают продуктам. Первоначально источниками твердых жиров служили сливочное масло или иные жиры животного происхождения. К их недостаткам, помимо высокой стоимости, относится высокое содержание холестерина [8]. С промышленным внедрением процесса гидрогенизации, произошедшем в начале XX века (образование твердых жиров путем насыщения жидких растительных масел водородом) основой для получения твердых жиров стали гидрогенизированные масла). Гидрогенизированные масла были дешевле, отличались отсутствием холестерина, были устойчивы к окислению кислородом воздуха и характеризовались рядом технологических преимуществ, таких как пластичность, взбиваемость, быстрое плавление [8]. Такие масла стали применять для придания желаемой текстуры пищевым продуктам на жировой основе, например маргаринам, спредам, шортенингам, кондитерским изделиям. Существенный недостаток процесса гидрогенизации состоит в том, что он осуществляется при высоких температурах (180-230 °С) и сопровождается образованием из природных цис-изомеров ненасыщенных жирных кислот – транс-изомеров, отличающихся пространственным расположением групп относительно двойной связи [8].

## **1.2. Последствия избыточного потребления насыщенных и транс-изомерных жирных кислот**

Насыщенные и транс-изомерные жирные кислоты, содержащиеся в составе твердых жиров, при их чрезмерном употреблении приводят к повышению уровня липопротеинов низкой плотности – ЛПНП («плохой холестерин») и снижению количества липопротеинов высокой плотности — ЛПВП («хороший холестерин»), что приводит к риску развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из наиболее распространенных причин смертности от неинфекционных заболеваний (НИЗ). Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), каждый год от НИЗ умирает 41 миллион человек, что составляет 71% всех случаев смерти в мире. В структуре смертности от НИЗ наибольшая доля приходится на сердечно-сосудистые заболевания, от которых каждый год умирает 17,9 миллионов человек и только вслед за ними следуют раковые заболевания (9 млн. случаев), респираторные заболевания (3,9 млн. случаев) и диабет (1,6 млн. случаев). Последние систематические мета-анализы и проспективные когортные исследования показали тесную связь уровня насыщенных жирных кислот и транс-изомеров жирных кислот, входящих в состав жирового компонента пищевого рациона, с развитием данных заболеваний [9]. По мнению ВОЗ, прекращение потребления транс-изомеров жирных кислот является ключевым условием охраны здоровья и сохранения жизни людей и рекомендует сократить потребление насыщенных жиров до уровня менее 10% и транс-жиров до уровня менее 1% от общей потребляемой энергии.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают первое место среди причин смертности россиян. В России в 2014 г. в структуре общей смертности от всех причин на долю болезней системы кровообращения приходилось 52,9%, в настоящее время 48%. По прогнозным оценкам, в ближайшие десятилетия ожидается увеличение риска развития ССЗ вследствие роста распространенности факторов риска этих заболеваний, напряженного и интенсивного темпа жизни со всеми вытекающими последствиями, а также увеличения доли населения пожилого возраста [10].

Эта проблема является сугубо медицинской лишь на первый взгляд, поскольку ни один из медицинских подходов, не способен в полной мере её решить. В 2015 году Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) определило, что частично гидрогенизированные масла больше не имеют статус признанных безопасными «GRAS», в связи с чем они должны быть исключены из состава пищевых

продуктов. С 2017 г. среди причин смертности в отдельный класс выделены "болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ". В связи с этим здоровому питанию должно быть уделено особое внимание. Эффективным методом контроля потребляемых транс- и/или насыщенных жиров с точки зрения здоровья населения, совместимости с внутренним рынком и защиты прав потребителей должно быть законодательство. План ВОЗ по исключению промышленно производимых транс-жирных кислот из пищи под названием «REPLACE» подразумевает выведение данного типа жиров за счет пропаганды вреда транс-изомеров жирных кислот и жесткого законодательного регулирования их использования в составе пищевых продуктов [11]. Поиск более здоровой альтернативы для снижения содержания насыщенных и/или транс-жиров привлек большое внимание со стороны исследователей, специалистов из пищевой промышленности и производителей продуктов питания в последние годы.

### **1.3. Альтернативы процесса гидрогенизации**

Насыщенные жиры, а также гидрогенизированные растительные масла, являющиеся источниками транс-изомерных жирных кислот, в пищевых продуктах выполняют самостоятельную технологическую функцию гелеобразователя, в связи с чем, для их исключения из состава пищевых продуктов необходимо искать альтернативные способы для поддержания их структуры. В настоящее время основной альтернативой использования гидрогенизированных растительных масел является применение смесей жидких (подсолнечное, соевое, рапсовое, кукурузное) и твердых растительных масел (кокосовое, пальмовое и их фракции) или жировых продуктов, полученных с использованием различных способов переэтерификации (химической, энзимной). При этом подходе обеспечивается снижение концентрации транс-изомерных жирных кислот, но возрастает массовая доля насыщенных, что сохраняет высокий риск последствий

употребления таких продуктов в составе пищевого рациона и не может стать способом алиментарной коррекции, направленной на снижение распространения сердечно-сосудистых заболеваний. Известно, что основными масличными культурами на территории Российской Федерации являются подсолнечник, кукуруза, рапс, лен (кудряш) и рыжик. Масла данных культур имеют очень низкое содержание насыщенных жирных кислот, поэтому их купажирование подразумевает использование тропических масел – пальмового и кокосового, не произрастающих на территории нашей страны, что является существенным барьером на пути к разработке импортозамещающих пищевых продуктов.

Еще одной альтернативой использования транс-изомеров жирных кислот является применение гелеобразователей – гидроколлоидов (пектины, крахмалы, камеди, каррагинаны и др.), позволяющих удерживать жидкие масла в структуре водного геля, создавая, необходимую консистенцию продукта [12]. Существенным ограничением данного подхода является то, что гидроколлоиды способны к гелеобразованию только в водных средах, при этом большинство пищевых продуктов, характеризующихся высоким содержанием насыщенных и транс-изомерных жирных кислот, являются либо безводными, либо с низким содержанием воды (до 40 %).

Таким образом, актуальной проблемой является поиск альтернативного пути замещения насыщенных и транс-изомерных жирных кислот, применимого в безводных системах или системах с низким содержанием воды, с использованием сырья, производимого на территории Российской Федерации в достаточном объеме для удовлетворения потребностей отечественного рынка.

#### **1.4. Новый подход к структурированию жидких масел**

В настоящее время технологией, наиболее близко подошедшей к решению данной проблемы, является использование олеогелей. Олеогели (органогели, структурированные пищевые масла) – представляют собой твердые дисперсные

системы, дисперсионной средой которых являются жидкие пищевые масла, а дисперсной фазой низко- или высокомолекулярные соединения, образующие постоянную однородную структуру [1]. Примеры образованных структур в зависимости от типа используемого гелеобразователя изображены на рисунке 1, адаптированном из [13].



Рисунок 1. Категории образованных структур олеогелей

Молекулы гелеобразователей подвергаются физическим преобразованиям для формирования трехмерной структуры. Как видно на рисунке 1, в случае использования низкомолекулярных гелеобразователей, образуются кристаллы, формирующие структуру, внутри которой иммобилизовано жидкое масло, а при использовании высокомолекулярных соединений это происходит за счет их волокнистой структуры. Формирование стабильной гелевой структуры сети происходит посредством комбинации ковалентных, электростатических,  $\pi$ - $\pi$ -стэкинговых, Ван-дер-Ваальсовых или водородных взаимодействий [14]. Олеогели обычно обладают вязкоупругими свойствами, они термообратимы и термодинамически стабильными ниже температуры гелеобразования [15]. При нагревании олеогелей выше температуры плавления гелеобразователя под действием тепловой энергии происходит разрыв физических взаимодействий между молекулами. В результате олеогели теряют свои твердые структуры и приобретают текучее состояние. Однако при повторном охлаждении олеогелей

снова происходят физические взаимодействия между молекулами гелеобразователя, в результате чего олеогели восстанавливают свою полутвердую структуру [1]. С другой стороны вязкоупругость относится к олеогелям, обладающих как вязкими, так и упругими свойствами. Известно, что при низкой скорости сдвига олеогели ведут себя как твердое тело и проявляют упругие свойства. При увеличении скорости сдвига физические взаимодействия между молекулами гелеобразователя под действием напряжения сдвига структура олеогелей нарушается, в результате чего они начинают течь. Для того чтобы это исключить, идет активный поиск различных гелеобразователей, благодаря которым можно изменять эти функционально-технологические свойства. Они должны быть эффективны при низких концентрациях, дешевы и допустимы к использованию в пищевых продуктах. В последнее десятилетие использование пищевых гелеобразователей для получения олеогелей позволило расширить спектр их применения до пищевой промышленности. Имеются примеры использования аналогов олеогелей для пищевых целей, например в составе бургеров, кексов, маффинов, печенья [16,17] и т.д. Несмотря на многообещающие результаты, описанные в имеющихся исследованиях, применение различных методов структурирования и разнообразия гелеобразователей, обеспечивающих сходство физических свойств олеогелей и жиросодержащих пищевых продуктов, несмотря на повышение питательной ценности, обеспечиваемой за счет использования растительных масел, а также положительные результаты органолептической оценки пищевых продуктов на данный момент отсутствуют коммерчески доступные пищевые продукты на основе олеогелей [17].

Тем не менее, область исследования олеогелей и их применения в составе пищевых продуктов является малоизученной и требует проведения фундаментальных исследований, направленных на разработку теоретических основ и практических решений в области получения олеогелей и изучения их свойств, применимых для многих видов пищевых продуктов, в традиционные составы которых входят твердые масла и жиры. Разработка и применение технологии олеогелей позволит снизить долю насыщенных и транс-изомерных

жирных кислот в пищевом рационе, что будет способствовать минимизации риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, связанного с употреблением жировых продуктов с высоким содержанием этих критически значимых пищевых веществ.

### 1.5. Природные воски как гелеобразователи жидких масел

Среди множества потенциальных гелеобразователей олеогелей наиболее подходящими для достижения целей работы, являются природные воски, отдельные фракции которых способны проявлять различную структурирующую способность [3,18]. Природные воски – это материалы, встречающиеся в природе во многих биологических системах, как животного, так и растительного происхождения. Воск представляет собой смесь алканов с прямой цепью, жирных кислот с длинной цепью, жирных спиртов с длинной цепью и сложных восковых эфиров [19,20]. Низкая полярность, длинная цепь и высокая температура плавления основных компонентов воска приводят к его превосходным кристаллизационным свойствам в жидких маслах [21]. Химический состав основных компонентов наиболее распространенных восков представлен в таблице 1.

Таблица 1. Химический состав основных компонентов различных восков

Тип воска	Компонент, %				Источник
	УВ	ВЭ	СЖК	СЖС	
Пчелиный	14	67	12	1	[22]
	26-27	58	8-9	6-7	[2]
Канделильский	50-51	29	7-9	-	[23]
Карнаубский	1-2	75-89	3-6	10-15	[19]
	1.5-3	84-88	3-3.5	2-3	[23]
Подсолнечный	-	68	16	10	[24]
	<0.5	96	3	<0.5	[2]

УВ - углеводороды, ВЭ – восковые эфиры, СЖК – свободные жирные кислоты, СЖС – свободные жирные спирты

Помимо основных представленных компонентов, в состав восков также входят минорные соединения. Минорными соединениями, присутствующими в восках могут быть альдегиды, кетоны, вторичные спирты, сложные эфиры стеролов. Их присутствие в различных количествах, связанное с различным происхождением воска делает его химический состав еще более сложным. Некоторые минорные компоненты могут сокристаллизоваться одновременно с основными компонентами, образуя фазы, которые могут изменить конфигурацию трехмерной сети [20]. Как видно из таблицы 1 химический состав восков может существенно варьироваться даже в пределах конкретного воска. Это может быть обусловлено различными факторами, например условиями окружающей среды, породой пчел или региона их обитания и т.д. [22,25,26].

В исследовании [2] в результате корреляционного анализа между химическим составом различных восков и их гелеобразующими свойствами показано, что углеводороды и жирные кислоты играют ключевую роль в консистенции и стабильности олеогелей на основе воска. Более того, авторы утверждают, что восковые эфиры приводят к образованию прочного, но хрупкого геля. Тем не менее, выбор восков одобренных к применению в пищевой промышленности ограничен. В этом случае может оказаться полезным извлечение различных восковых компонентов из разрешенных восков и поиск их оптимального состава для гелеобразования. Как показано [2] пчелиный воск содержит все основные группы потенциальных гелеобразователей (УВ - углеводороды, ВЭ – восковые эфиры, СЖК – свободные жирные кислоты и СЖС – свободные жирные спирты) и согласно ТР ТС разрешен не только как глазирователь, но и как носитель. Учитывая, что комбинированием различными восками можно добиваться улучшения функционально-технологических свойств [3], то можно предположить, что и комбинирование отдельными фракциями позволит достичь оптимальных функционально-технологических характеристик олеогеля. В связи с тем, что пчелиный воск обладает разнообразным фракционным составом и разрешен к применению в пищевой промышленности

это делает его потенциальным кандидатом на фракционирование с целью дальнейшего структурирования восковыми компонентами жидких пищевых масел.

### **1.6. Существующие подходы к фракционированию восков**

Существует множество методов фракционирования восков, так например первые разработки принадлежат Холлоуэю П. [27] и Туллочу А. [25]. В этих работах авторы решили задачу определения фракционного состава воска методом тонкослойной хроматографии. Один новейших методов определения фракционного состава восков был предложен [2] с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектором светорассеивания. Препаративные методы были разработаны несколько позже с применением колоночной хроматографии. Используя эти методы можно эффективно фракционировать воски из различных источников. Однако при таком подходе существует проблема, связанная с использованием таких элюентов как хлороформ, бензол, четыреххлористый углерод, метиленхлорид и метил-трет-бутиловый эфир, отсутствующие в списке экстракционных растворителей для пищевых продуктов в соответствии с ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств». С этой точки зрения в исследовании [28] акцент был сделан на методе фракционирования путем последовательного элюирования гексаном и смесью гексан: ацетон (90:10). Важно отметить, что согласно ТР ТС 029/2012 ацетон в качестве экстракционного растворителя разрешен для всех видов использования, при условии, что в результате остатки или производные присутствуют только в технически неизбежных количествах (для масел пищевых 0,1 мг/кг); гексан может использоваться для производства или фракционирования жиров и масел, если остаточное количество гексана не будет превышать значения 1 мг/кг. В последние годы для фракционирования активно используется подход, основанный на

разделении различных компонентов с помощью препаративной жидкостной флеш-хроматографии [29]. В препаративной флеш-хроматографии используется давление воздуха для ускорения потока растворителя, что значительно сокращает время, необходимое для разделения образца. Обычно этот метод широко используется для разделения смесей молекул на их отдельные составляющие, которые впоследствии могут быть использованы для различных исследований [30]. На данный момент отсутствуют сведения о возможности фракционирования восков, в частности пчелиного воска с помощью препаративной флеш-хроматографии, а также применении полученных фракций для оценки их гелеобразующих свойств при структурировании жидких пищевых масел.

Таким образом, обобщая проведенный литературный обзор можно сделать заключение о том, что в качестве альтернативы для замены твердых жиров, содержащих насыщенные и транс-изомерные жирные кислоты, входящих в число ключевых алиментарных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, рассматриваются олеогели. На данный момент существует необходимость поиска эффективных гелеобразователей для получения олеогелей. В связи с тем, что пчелиный воск обладает наиболее многокомпонентной системой (углеводороды, восковые эфиры, свободные жирные кислоты и спирты) и разрешен к применению в пищевой промышленности - он является наиболее подходящей системой для фракционирования с помощью препаративной флеш-хроматографии с использованием растворителей, одобренных к применению в пищевой промышленности согласно ТР ТС 029/2012.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ: СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1. Схема проведения исследований

Систематизация научных данных и экспериментальные исследования проведены в соответствии с поставленными задачами в ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Общая схема проведения эксперимента представлена на рисунке 2.



Рисунок 2. Организационно-иерархическая структура диссертационной работы

На первом этапе проведено изучение, анализ и обобщение литературных данных описанных в зарубежной и российской научной литературе о возможности структурирования жидких пищевых масел с помощью различных компонентов. Второй этап заключался в постановке и обосновании цели и задач исследования, определении объектов и методов исследования, использование которых позволит всеобъемлюще изучить свойства отдельных компонентов пчелиного воска (углеводороды, восковые эфиры, свободные жирные кислоты и спирты), а также разрабатываемых липидных систем (олеогелей), структурированных с помощью этих компонентов. Третий этап заключался в изучении возможности структурирования жидких пищевых масел, характеризующихся различным жирнокислотным составом, путем применения пчелиного воска; поиск закономерностей и корреляций между изучаемыми параметрами. Четвертый этап представлял собой разработку метода фракционирования пчелиного воска с дальнейшим проведением анализа компонентного состава полученных фракций и изучением их гелеобразующей способности в составе жидкого пищевого масла. Пятый этап заключался в исследовании роли отдельных фракций пчелиного воска и их комбинаций в регулировании свойств олеогелей. В рамках шестого этапа изучено влияния пчелиного воска и комбинаций его отдельных фракций на окислительную стабильность пищевых олеогелей на основе подсолнечного масла. Седьмой этап заключался в изучении влияния витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> на свойства олеогелей и определении сохранности этих биологически активных веществ. На заключительном этапе был разработан и исследован пищевой продукт с использованием в качестве альтернативы твердого жира – олеогеля, структурированного восковыми компонентами.

## 2.2. Характеристика используемых материалов и реактивов

В качестве объектов исследований выступали: подсолнечное, льняное и оливковое масла, рыбий жир, заменитель молочного жира, витамины D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>, пчелиный воск, его отдельные фракции и их комбинации, а также олеогели, структурированные этими компонентами и растительно-жировые спреды.

### *Масла и жиры:*

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

- Подсолнечное рафинированное дезодорированное (ЭФКО, Россия);
- Рыбий жир очищенный (Тверская фармацевтическая фабрика, Россия);
- Масло оливковое рафинированное с добавлением масел оливковых нерафинированных (Aceites Albert S.A, Испания);
- Масло льняное нерафинированное (Бизнесойл, Россия);
- Заменитель молочного жира «Эколакт 1403-33» (ЭФКО, Россия).

### *Воски:*

Пчелиный воск (Дом воска, Россия) соответствующий по органолептическим и физико-химическим показателям ГОСТ 21179-2000 «Воск пчелиный. Технические условия»;

### *Растворители и реактивы:*

Для препаративной хроматографии использовали гексан, ацетон, изопропиловый спирт аналитической чистоты (Компонент-Реактив, Россия). Для аналитических целей использовали хлороформ, уксусную кислоту, серную кислоту концентрированную (Компонент-Реактив, Россия), метанол для хроматографии, пара-анизидин 99% (Sigma-Aldrich, США), жирорастворимый витамин D<sub>3</sub> (холекальциферол) (ТСИ, Япония); жирорастворимый витамин K<sub>2</sub> (менахинон) (ТСИ, Япония), калий йодистый (Ленреактив, Россия).

### *Ингредиенты:*

- Сухое обезжиренное молоко, высший сорт (Россия) ГОСТ 33629-2015;
- Пищевая соль (Предприятие МС, Россия) ГОСТ Р 51574-2018;
- Моноглицериды (Danisco, Дания);
- Соевый лецитин (Россия) ГОСТ 32052-2013;
- Ароматизатор (Россия) ГОСТ 32049-2013;
- Лимонная кислота (Россия) ГОСТ 908-2004;
- Сорбиновая кислота (Россия) ГОСТ 32779-2014.

### **2.3. Методы исследования компонентного состава гелеобразователей<sup>1</sup>**

#### *Инфракрасная спектроскопия с преобразованиями Фурье*

Образцы растительных масел, воска, его фракций и олеогелей анализировали методом ИК-Фурье спектроскопии с помощью спектрометра Tensor 27 (Bruker Optik GmbH, Germany) и приставки MIRacleATR, оснащенной кристаллом германия; использовали программное обеспечение Opus 6.0. Измерения проводили в соответствии с [31] с незначительными изменениями. Все измерения были проведены при комнатной температуре, для изучения ИК-спектра олеогеля в кристаллизованном твердом виде. Образцы воска и олеогелей были предварительно нагреты до 90°C и выдержаны в течение 30 минут до полного расплавления воска или его компонентов. После этого 50-60 мкл аликвоты образца наносили на поверхность кристалла германия, выдерживали 5 минут до кристаллизации и регистрировали спектр. Каждый образец был проанализирован в 4-х повторностях. Спектры обрабатывали в автоматическом режиме, включая следующие этапы: коррекция погрешности нарушенного полного внутреннего отражения спектра, коррекция вклада паров воды и углекислого газа из воздуха, приведение к базовой линии и нормализация. При расчетах использовали среднее значение по трем наиболее близким для каждого образца спектрам.

---

<sup>1</sup> Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории химии пищевых продуктов к.фарм.н. Малинкиным А.Д., с научным сотрудником лаборатории химии пищевых продуктов к.б.н. Макаренко М.А.

### *Тонкослойная хроматография*

Тонкослойную хроматографию использовали для качественной оценки фракционного состава пчелиного воска и его отдельных фракций. Для анализа использовали алюминиевые пластины (Merck, Германия) покрытые силикагелем (толщина слоя 200 мкм, средний размер частиц 10-12 мкм). Образцы растворяли в хлороформе в концентрации 0,005 г / мл. Затем аликвоту 3 мкл наносили на пластинку. Разделение проводили в камере, насыщенной парами элюента (гексан-ацетон 96:4). Далее, пластину опрыскивали 20% - ным водным раствором сульфата аммония с 3% -ной серной кислотой. Затем пластины нагревали до 180 °С на нагревательной плитке и выдерживали до появления пятен. Планшеты фотографировали в УФ-свете на длине волны 254 нм.

### *Высокоэффективная жидкостная хроматография*

Количественную оценку химического состава пчелиного воска и его фракций проводили с использованием аналитической методики, описанной в работе [2]. Был использован хроматограф Agilent Technologies 1260, система Infinity оснащена колонкой Macherey-Nagel EC 250 / 4.6, колонкой Nucleosil 100-5 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) и детектором Alltech 3300 ELSD (Grace Alltech, Бельгия).

### *Твердофазная микроэкстракция с газовой хроматографией-масс спектрометрией в свободном пространстве*

Общие принципы твердофазной микроэкстракционной газовой хроматографии-масс-спектрометрии в свободном пространстве (ТФМЭ-ГХ-МС в свободном пространстве) для определения летучих органических соединений присутствующих в составе пчелиного воска и его фракций были адаптированы из работы [31] с некоторыми изменениями. Около 1 г образца переносили в пробирку на 20 мл, добавляли 9 мл воды (очищенной в системе MilliQ) и затем пробирку закрывали обжимной крышкой и прокладкой из ПТФЭ/силикона (Supelco). Все образцы предварительно нагревали на водяной бане в течение 30 мин при 70–75°С так, чтобы уровень воды в бане был выше уровня образца. Затем волокно располагалось над образцом так, чтобы до поверхности образца

оставалось не более 5 мм. Образец с волокном инкубировали 20 мин при 70–75°C. Затем иглу было быстро удалено и немедленно помещали в инжектор, после чего нагревали до 270°C в течение 5 мин для десорбции. Использовали газовый хроматограф Agilent Technologies 7890A, с квадрупольным масс-детектором Agilent Technologies 5975C (США) и пламенно-ионизационным детектором.

Аналиты идентифицировали с использованием программы поиска масс-спектров NIST для Масс-спектральной библиотеки NIST/EPA/NIH Ver. 2.0g, сборка May 192,01100 с набором коммерчески доступных библиотек масс-спектров (коэффициенты совпадения более 800).

#### **2.4. Определение содержания общих полярных компонентов в маслах**

Общее содержание полярных веществ (%TPM) в маслах анализировали с использованием тестера Testo® 270 (Testo Inc., Германия) в соответствии с исследованием [32]. Каждый образец анализировали в трех повторностях и рассчитывали среднее значение со стандартным отклонением.

#### **2.5. Идентификация жирнокислотного состава масел и олеогелей<sup>2</sup>**

Состав жирных кислот в маслах и олеогелях определяли на газовом хроматографе Agilent Technologies 7683B Series (США) с пламенно-ионизационным детектором на 100-метровой колонке Agilent J&W GC Select FAME (Нидерланды), 25 мм × 0,25 мкм согласно исследованию [32].

#### **2.6. Подход к определению маслосвязывающей способности олеогелей**

Уровень маслосвязывающей способности проводился на центрифуге серии CM-50 SIA «ELMI» (Латвия). В центрифужные пробирки, предварительно

---

<sup>2</sup> Выполнено совместно с научным сотрудником лаборатории химии пищевых продуктов к.б.н. Макаренко М.А.

взвешенные, помещали приблизительно  $1,000 \pm 0,001$  г олеогеля и взвешивали. Пробирки центрифугировали при 11000 g в течение 10 мин. Маслосвязывающую способность рассчитывали по стандартным формулам, описанным в работе [33]. Перед испытанием пробирки с олеогелями выдерживали в течение 24 ч при температуре  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## **2.7. Методы определения гигиенических показателей олеогелей<sup>3</sup>**

Определение *перекисного числа* проводили титриметрическим методом в соответствии с [34].

Измерение *анизидинового числа* (АЧ) проводили спектрофотометрическим способом в соответствии с [35].

*Удельный коэффициент экстинкции* ( $E_{232}$ ), отражающий содержание конъюгированных диенов определяли по методу в соответствии с [36].

*Общее окисление* было рассчитано по следующей формуле «Общее окисление = АЧ + 2ПЧ», согласно [37].

## **2.8. Ускоренный метод определения окислительной стабильности олеогелей**

Определение устойчивости олеогелей к окислению проводили по периоду индукции, используя прибор OXITEST, представляющий собой реактор окислительной стабильности (Velp, Италия). Исследование проводили в соответствии с [38].

---

<sup>3</sup> Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.б.н. Саркисяном В.А.

## **2.9. Методы определения витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> в составе олеогелей**

Определение сохранности витамина D<sub>3</sub> в олеогелях осуществляли в соответствии с методикой [39].

Определение сохранности витамина K<sub>2</sub> в олеогелях осуществляли в соответствии с методикой [40].

## **2.10. Определение морфологических особенностей кристаллов в гелеобразователях и олеогелях**

Исследования морфологии кристаллов пчелиного воска и его фракций проводили на микроскопе Zeiss Axio Observer Z1 с дифференциально-интерференционным контрастом (Carl Zeiss, Германия). Пробоподготовка заключалась в предварительном растворении 0,05г образца в 2 мл хлороформа. После чего аликвоту 3-4 мкл наносили на предметное стекло, отгоняли излишки растворителя с помощью резиновой груши.

Исследования морфологии кристаллов олеогелей проводили на микроскопе Zeiss Axio Imager Z1 с модулем поляризации (Carl Zeiss, Германия) оснащенным цифровой камерой AxioCam (Zeiss) по методике, заключающейся в нанесении небольшой капли расплавленного олеогеля на нагретое предметное стекло, после чего образец накрывали покровным стеклом и охлаждали со скоростью 1 °C/мин до заданной температуры. Размер кристаллов в олеогелях определяли с помощью 2 микрофотографий в двух повторностях с использованием программы JMicroVision.

## **2.11. Метод определения текстурных характеристик гелеобразователей, олеогелей и спредов**

Твердость и модуль упругости олеогелей были исследованы с помощью универсальной испытательной машины EZ Test SX (Shimadzu, Япония). Олеогели для данного исследования были приготовлены и разлиты в цилиндрические пробирки объемом 5 мл с внутренним диаметром 14 мм. Для образования структуры олеогели выдерживали в климатической камере КК240 (Pol-Еко-Апаратура, Польша) течение 24 часов. Для проведения анализа, индентер, представляющий собой цилиндр диаметром 12 мм, погружали на расстояние 6 мм вглубь образца со скоростью хода 5 мм/мин. Для обработки данных использовали программное обеспечение Trapezium X (Shimadzu, Япония).

Испытание на растекаемость олеогелей проводили с использованием насадки конической формы (конус  $60^\circ$ , Perspex). Образцы олеогелей разливали в обратный конус и выдерживали в течение 24 часов при заданной температуре в климатической камере. Затем образцы подвергались воздействию конуса, перемещающегося со скоростью 15 мм/с на расстояние 9 мм вглубь образца. Энергию сдвига (площадь под реологической кривой) и модуль Юнга измеряли автоматически с помощью программы Trapezium X (Shimadzu, Япония). Предел текучести был измерен и охарактеризован, в соответствии с [41] с адаптацией к автоматизированным испытательным машинам [42].

Испытание на определение текстурных свойств спредов проводили и использованием насадки цилиндрической формы (диаметр 12 мм). Спреды были предварительно подготовлены и разлиты в емкости объемом 200 мл (ширина 7 мм, длина 10 мм). Индентер погружали на расстояние 10 мм вглубь образца со скоростью 10 мм/мин.

## 2.12. Определение термических характеристик гелеобразователей, олеогелей и спредов<sup>4</sup>

Температуры кристаллизации и плавления пчелиного воска, его отдельных фракций, их комбинаций и олеогелей были изучены с помощью дифференциально-сканирующего калориметра DSC 3 (Mettler-Toledo, Швейцария). Для охлаждения использовали модуль TC45 (Huber, Германия). Навеску массой (6-10 мг) помещали в тигель и закупоривали. Измерение проводили в 5 этапов, среди которых охлаждение, стабилизация, нагрев, стабилизация, охлаждение. На первом этапе образцы были охлаждены до  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем стабилизированы при этой температуре в течение 3 минут и нагреты до  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ . После этого образцы стабилизировали при этой температуре 4 минуты и затем охлаждены до  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Скорость нагрева и охлаждения на всех этапах составляла  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

Для построения качественных фазовых диаграмм образцы полученных олеогелей охлаждали до температуры  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и выдерживали в течение 24 часов. Для построения фазовой диаграммы исследуемые образцы олеогелей разливали по 3 мл в пробирку на 5 мл, диаметром 19 мм, после чего хранили при постоянной температуре в диапазоне от 20 до  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  каждые 24 часа повышая температуру на  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Подтверждение гелеобразования проводили визуально по оценке неспособности образцов течь после переворачивания. Полученные данные характеризовали как: гель, гель-золь или жидкость [43].

Для измерения температур плавления и энтальпии жирового продукта (спреда) навеску массой 8-10 мг помещали в алюминиевый тигель и герметично закрывали. Цикл измерения включал 3 этапа: охлаждение (до  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ), стабилизация ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин), нагрев (до  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ).

---

<sup>4</sup> Выполнено совместно с научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.т.н. Фроловой Ю.В.

### 2.13. Метод органолептического анализа спредов

Выявление характеристик, способных влиять на восприятие образцов спредов определяли в соответствии с [44].

### 2.14. Подход к определению цветовых характеристик спредов

Измерение цвета спредов проводили с помощью портативного спектрофотометра BS 7016 (3NH, Китай). Цветовая шкала CIE Lab представляет собой стандартную шкалу для оценки индекса светлоты ( $L^*$ ), который варьируется от черного (0) до белого (100). Параметр ( $a^*$ ) варьируется от зеленого (отрицательные значения) до красного (положительные значения), компонент ( $b^*$ ) варьируется от синего (отрицательные значения) до желтого (положительные значения). Значения  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  были автоматически рассчитаны с помощью программного обеспечения прибора. Измерения проводили в 4 различных точках спреда. Индекс белизны (WI) рассчитывали по формуле (1), представленной в исследовании [45]:

$$WI = \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (1)$$

Индекс желтизны (YI) рассчитывали согласно формуле (2), представленной в исследовании [46]:

$$YI = 142.86 \frac{b^*}{L^*} \quad (2)$$

### 2.15. Методы статистической обработки экспериментальных данных

Статистическая обработка данных и их визуализация осуществлялась при помощи пакета программ Statistica 10 (StatSoft Inc, США) и OriginPro 2018 (Origin, Великобритания). Эксперименты проводили в трех-пятикратной повторности. Уровень значимости составлял ( $p < 0,05$ ) с уровнем достоверности 95%.

### ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СТРУКТУРИРОВАНИЯ ЖИДКИХ ПИЩЕВЫХ МАСЕЛ ПЧЕЛИНЫМ ВОСКОМ

Материалы, опубликованные в данном разделе представлены в работах [47–53].

В настоящее время разными исследовательскими группами были получены олеогели, содержащие различные жидкие пищевые масла: подсолнечное [54], льняное [55], оливковое [56], рыбий жир [57], а также их комбинации [48,51]. Пищевые масла отличаются между собой в первую очередь по жирнокислотному составу. Наиболее распространенными жирными кислотами жидких пищевых масел растительного происхождения являются длинноцепочечные ненасыщенные олеиновая (C18:1), линолевая (C18:2), линоленовая (C18:3), а также очень длинноцепочечные жирные кислоты эйкозапентаеновая (C20:5) и докозагексаеновая (C22:6), входящие в состав животных жиров. Использование технологии структурирования жидких пищевых масел позволяет получать системы (олеогели), сохраняющие твердую консистенцию без добавления жиров твердой консистенции, которыми являются триглицериды с насыщенными и транс-изомерными кислотами [53]. Одним из наиболее распространенных гелеобразователей для получения олеогелей являются воски, в частности, пчелиный воск. Пчелиный воск представляет собой сложную смесь, включающую различные компоненты: углеводороды, сложные эфиры, свободные жирные кислоты, а также спирты [2,47,50]. В настоящее время, различными коллективами авторов проведены исследования способности пчелиного воска структурировать лишь отдельные жидкие растительные масла. При этом не всегда приводится точный состав применяемого пчелиного воска, что затрудняет сравнение свойств получаемых гелей между отдельными исследователями. Основным диапазоном исследуемых концентраций гелеобразователя в олеогелях составляет от 0,5 до 10,0 масс.%, критическая концентрация гелеобразования для пчелиного воска для большинства масел составляет 6 масс.% [58,59]. При этом на данный момент

недостаточно изучено влияние типа масла на процесс структурирования масел пчелиным воском. Среди факторов, способных повлиять на свойства олеогелей в первую очередь может быть жирнокислотный состав масел, как основной отличительный признак всех пищевых масел. В зависимости от содержания насыщенных жирных кислот, масла имеют разные температуры кристаллизации и плавления, что может влиять на процессы кристаллизации в олеогелях. Кроме того, свою роль могут иметь полярные вещества нелипидной природы, входящие в состав масел [52,60,61]. Данные вещества разнообразны по своей природе, однако общим для них является низкая молекулярная масса и высокая полярность. Значимость минорных веществ была показана, в частности, для гелей на основе этилцеллюлозы в оливковом масле [52,62]. В настоящее время отсутствует систематическое представление о направленности влияния отдельных факторов состава масел на свойства олеогелей на основе пчелиного воска. При этом получение олеогелей с заданными свойствами требует понимания роли всех компонентов в составе продукта на свойства олеогеля [52].

Таким образом, установление взаимосвязей между составом масел и свойствами полученных олеогелей на основе пчелиного воска позволит проводить их направленную разработку.

### 3.1. Определение жирнокислотного состава масел

На первоначальном этапе был оценен жирнокислотный состав используемых масел, представленный в таблице 2.

Таблица 2. Жирнокислотный состав используемых масел [52]

Формула жирной кислоты	Тип масла			
	ОМ	ЛМ	РЖ	ПМ
6:0	-	-	-	-
8:0	-	-	0,02 ± 0,01	-
10:0	-	-	0,02 ± 0,01	-
12:0	-	-	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00
13:0	-	-	-	-

Таблица 2. Жирнокислотный состав используемых масел [52]

Формула жирной кислоты	Тип масла			
	ОМ	ЛМ	РЖ	ПМ
14:0	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01	3,85 ± 0,14	0,10 ± 0,02
15:0	-	0,03 ± 0,01	0,33 ± 0,11	-
16:0	12,56 ± 0,11	6,17 ± 0,14	9,66 ± 0,15	6,31 ± 0,31
16:1	0,15 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,37 ± 0,11	0,03 ± 0,01
16:1 9-с	1,05 ± 0,12	0,12 ± 0,03	7,01 ± 0,21	0,12 ± 0,08
17:0	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,23 ± 0,05	0,05 ± 0,02
17:1	0,16 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,44 ± 0,05	0,04 ± 0,01
18:0	2,84 ± 0,10	4,32 ± 0,23	2,02 ± 0,10	3,54 ± 0,16
18:1 9-т	0,21 ± 0,08	-	2,45 ± 0,20	
18:1 9-с	71,09 ± 0,47	20,76 ± 0,28	14,43 ± 0,27	27,31 ± 0,32
18:1 11-т	2,28 ± 0,23	0,79 ± 0,13	4,26 ± 0,16	0,64 ± 0,07
18:2 9-с, 12-т	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01	1,23 ± 0,14
18:2 9-т, 12-с	-	-	0,03 ± 0,01	1,14 ± 0,08
18:2	8,08 ± 0,13	46,73 ± 0,32	1,83 ± 0,12	58,84 ± 0,48
18:3 ω-3	1,13 ± 0,21	20,43 ± 0,31	1,35 ± 0,17	0,29 ± 0,03
20:1	0,29 ± 0,07	0,34 ± 0,00	14,67 ± 0,21	0,30 ± 0,10
20:5	-	-	7,86 ± 0,19	-
22:0	-	-	0,04 ± 0,02	0,62 ± 0,11
22:1	-	-	10,91 ± 0,14	-
22:4	-	-	0,44 ± 0,05	-
22:5	-	-	1,51 ± 0,10	-
22:6	-	-	15,18 ± 0,24	-
<b>Общее количество</b>				
<b>НЖК</b>	15,5 ± 0,6	10,7 ± 0,5	16,2 ± 0,4	10,7 ± 0,3
<b>МНЖК</b>	75,2 ± 1,5	22,1 ± 1,2	54,5 ± 1,1	28,4 ± 0,6
<b>ПНЖК</b>	9,3 ± 0,4	67,2 ± 0,3	28,3 ± 0,3	61,5 ± 0,5
<b>cIV<sup>1</sup></b>	85,3 ± 1,8	160,4 ± 2,3	164,2 ± 1,9	137,0 ± 1,7
<b>ТРМ</b>	5,5 ± 0,5	17,5 ± 0,5	4,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5

<sup>1</sup>cIV – расчетное йодное число, ТРМ – общее полярное вещество, с – цис-изомер, т – транс-изомер; НЖК – насыщенные жирные кислоты; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ОО – оливковое масло; ЛМ – льняное масло; РЖ – рыбий жир; ПМ – подсолнечное масло

Полученные значения находились в допустимом диапазоне для данного типа масел (CODEX-STAN). Как видно из таблицы 2, наибольшее содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) отмечено в подсолнечном и льняном

маслах. Оливковое масло содержит наибольшее количество мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) [52]. Наличие очень длинноцепочечных жирных кислот ( $C \geq 20$ ) характерно исключительно для рыбьего жира. Среди них есть ПНЖК с пятью или более ненасыщенными связями, в частности эйкозапентаеновая ( $C_{20:5}$ ), докозапентаеновая ( $C_{22:5}$ ) и докозагексаеновая ( $C_{22:6}$ ) кислоты. Эти кислоты отсутствуют в исследуемых растительных маслах, в которых ПНЖК представлены линолевой ( $C_{18:2}$ ) и линоленовой ( $C_{18:3}$ ) кислотами. Поэтому прямая оценка влияния жирнокислотного состава масла на свойства олеогелей ограничена из-за практически полного отсутствия в растительных маслах длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот ( $C > 20$ ). В связи с этим для каждой пробы рассчитывали йодное число (табл. 3) как интегральный показатель степени ненасыщенности масел на основании полученных данных. Наибольшее значение  $cIV$  наблюдали для образцов РЖ (164,2 г) и ЛМ (160,4 г). Наименьшее значение  $cIV$  характерно для оливкового масла (85,3 г). Кроме того, определяли содержание полярных компонентов (ТРМ) в исследуемых маслах (табл. 2). Почти все образцы имели одинаковое содержание ТРМ (4–5 %), за исключением образца ЛМ, характеризующегося высоким числом полярных материалов, равным  $17,5 \pm 0,5$  %. Обычно увеличение ТРМ связывают с окислительными процессами, происходящими при термической обработке и обжаривании масел. В этом случае высокое содержание полярных компонентов в ЛМ, по-видимому, связано с высоким содержанием полярных нежировых веществ (воды, фенольных соединений и т.д.) [52,63].

### **3.2. Технология приготовления олеогелей и обоснование выбора**

Для приготовления олеогелей был использован пчелиный воск (ветеринарное свидетельство № 803631516 от 18.09.2018), имеющий органолептические и физико-химические показатели, представленные в таблице 3.

Таблица 3. Органолептические и физико-химические показатели пчелиного воска

Наименование показателя	Характеристика
Цвет	Светло-жёлтый
Запах	Естественный, восковой
Структура в изломе	Однородная
Массовая доля воды, %	0,3-0,4
Показатель преломления при 75°С	1,4415
Кислотное число, мг КОН/г	18
Число омыления, мг КОН/г	91
Эфирное число, мг КОН/г	73

Технология приготовления олеогелей была адаптирована на основе имеющихся литературных данных [1,13,64]. Для приготовления олеогелей использовали постоянную концентрацию гелеобразователя равную 6 %. Выбор концентрации гелеобразователя основан на рекомендуемых значениях для различных восков, описанных в исследовании [13,65], которые составляют 4–6% в зависимости от типа масла и воска. Верхний предел диапазона был выбран для получения наиболее твердых гелей. Олеогели получали путем предварительного нагревания дисперсионной среды (масла) в стеклянном стакане до (90°С), после чего вносили дисперсную фазу (гелеобразователь) и выдерживали в течение 30 мин при постоянном перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 300 об/мин до полного расплавления кристаллов гелеобразователя. Стоит отметить, что визуально, гелеобразователь может казаться расплавленным и при меньшем времени выдерживания, однако часть компонентов при недостаточном времени нагревания может быть не полностью расплавлена, что повлияет на технологические характеристики олеогелей. Для структурирования полученную смесь разливали на аликвоты и охлаждали до  $23 \pm 1$  °С со скоростью 1 °С/мин, а затем выдерживали в течение 24 ч перед испытанием. Температуру и скорость охлаждения контролировали в климатической камере КК240 (Pol-Eko-Aparatura,

Польша). Внешний вид используемых масел и образованных на их основе олеогелей представлен на рисунке 3.

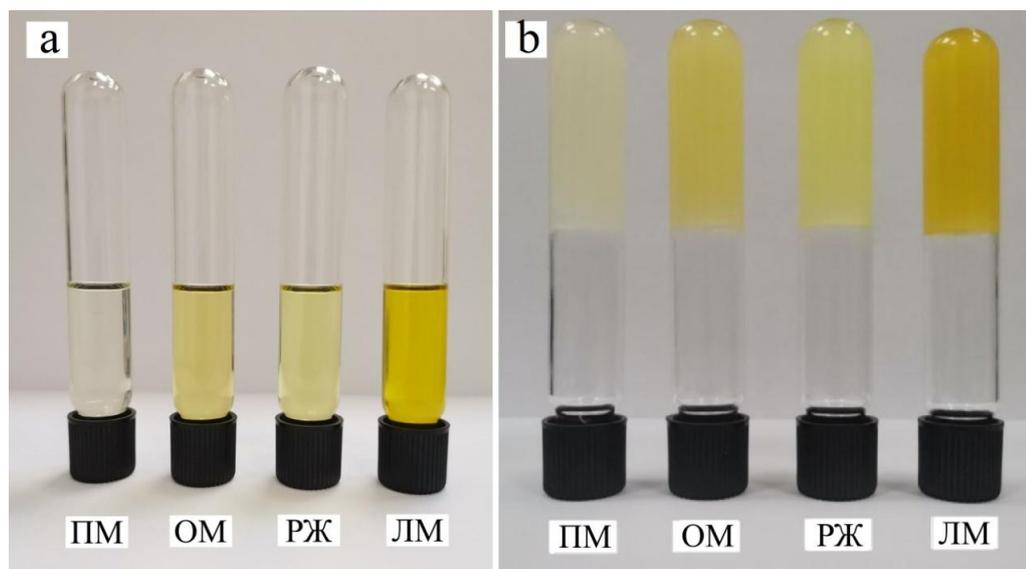


Рисунок 3. Внешний вид используемых масел (а) и образованных на их основе олеогелей (b)

Как видно из рисунка 3, цвет олеогелей характерен цвету используемого масла и при структурировании не происходит значительных изменений данного показателя.

### 3.3. Изучение технологических характеристик олеогелей

#### 3.3.1 Изучение микроструктурных особенностей

Микроструктура олеогелей была изучена для оценки влияния типа масляной среды на морфологию кристаллов. Морфология и размер кристаллов, образующихся в олеогелях, влияют на структурные характеристики готовых олеогелей и, впоследствии на пищевые продукты, содержащие их [63]. Морфологию кристаллов олеогелей, полученных на различных маслах, определяли с помощью светового поляризационного микроскопа (рисунок 4).

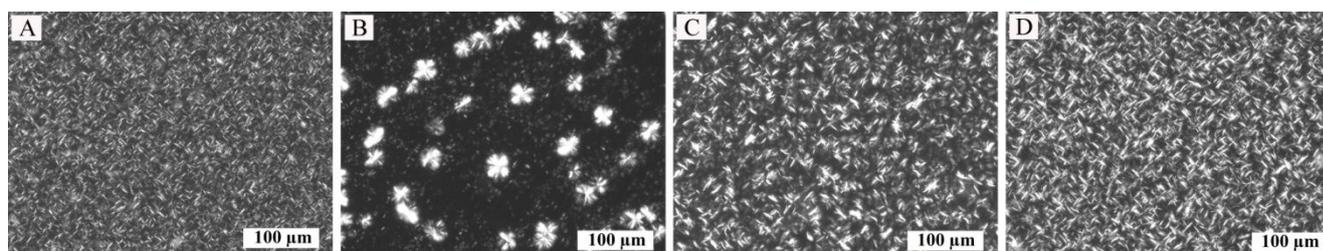


Рисунок 4. Микрофотографии образцов олеогелей при увеличении ( $\times 200$ ): А – олеогель на основе рыбьего жира (РЖ), В – олеогель на основе льняного масла (ЛМ), С – олеогель на основе подсолнечного масла (ПМ), D – олеогель на основе оливкового масла (ОМ)

Как показано на рисунке 4 кристаллы имеют некоторые различия в форме и размере. Кристаллы, формирующиеся в олеогелях на основе масел РЖ, ПМ и ОМ, схожи с игольчатой формой, однако согласно работе [66] они характеризуются пластинчатой формой. Кристаллы данных олеогелей имеют идентичный внешний вид, в отличие от кристаллов, образующихся в ЛМ олеогелях [52]. Олеогели ЛМ образуют несколько видов кристаллов, преимущественно сферолитической формы. В олеогелях на основе РЖ, ПМ и ОМ с концентрацией 6 масс.% гелеобразователя образуется компактная сетка (рисунок 4 А, С, D), за счет высокой концентрации пчелиного воска обеспечивается высокая степень перенасыщения, что ускоряет зародышеобразование и последующие гелеобразование. Для детального анализа кристаллов, сформировавшихся в исследуемых олеогелях, был проведен расчет их фрактальной размерности, лакуарности и среднего размера (таблица 4) [52].

Таблица 4. Результаты анализа микроструктуры олеогелей: средний размер, фрактальная размерность ( $D$ ), лакунарность ( $A$ )

Тип масла в олеогеле	$L_c$ , мкм	$D$	$A$
РЖ	$7,10 \pm 1,34^a$	$2,82 \pm 0,04^a$	$0,24 \pm 0,05^a$
ЛМ	$29,31 \pm 4,01^b$	$2,49 \pm 0,04^b$	$0,81 \pm 0,05^b$
ПМ	$14,33 \pm 1,74^c$	$2,75 \pm 0,04^a$	$0,31 \pm 0,05^a$
ОМ	$11,70 \pm 1,72^c$	$2,81 \pm 0,04^a$	$0,24 \pm 0,05^a$

РЖ – рыбий жир, ЛМ – льняное масло, ПМ – подсолнечное масло, ОМ – оливковое масло,  $L_c$  – размер кристаллов. Буквами  $a$ ,  $b$ ,  $c$  обозначены отличающиеся между собой образцы, с достоверностью ( $p < 0,05$ )

Анализ фрактальной размерности методом подсчета коробок позволяет численно оценить однородность распределения массы в сети олеогеля. Чем показатель  $D$  более приближен к 3, тем более равномерно распределена (или сгруппирована) масса в сети. В дополнение к фрактальной размерности, при описании некоторых свойств олеогелей может выступать лакунарность ( $A$ ), поскольку она дает подробные сведения о распределении и однородности полостей, которые, в свою очередь, могут быть ответственны за макроскопические свойства системы (олеогелей). По показателям фрактальной размерности и лакунарности образец на основе ЛМ значительно отличался от других олеогелей, что говорит о его более неравномерной структуре с большим количеством пустых полостей, что может приводить к низкой маслосвязывающей способности и отделению масла из олеогелей со временем, а также к снижению показателей твердости [66].

Еще одним показателем, характеризующим морфологию кристаллов, а именно распределение кристаллов по размерам являлся средний размер ( $L_c$ ) [52]. Согласно результатам (таблица 4), наименьшим показателем  $L_c$  обладали кристаллы олеогелей РЖ. Наибольшие значения  $L_c$  были характерны для кристаллов олеогеля на ЛМ. В работе [67] в олеогелях, структурированных моноглицеридами авторы нашли зависимость между маслосвязывающей

способностью и  $L_c$ . Так, авторы пришли к выводу, что кристаллы, обладающие меньшим значением  $L_c$  проявляют лучшую способность к связыванию масла, за счет увеличения площади поверхности, доступной для связывания масла.

### 3.3.2 Определение маслосвязывающей способности

Для подтверждения гипотезы о связи распределения и размера кристаллов гелеобразователя в олеогелях с его маслосвязывающей способностью (МСС) и текстурными показателями проводили соответствующие исследования. Как правило, олеогели содержат в своем составе большое количество масла, в среднем 90-96 масс.%, поэтому для их успешного использования в качестве альтернативы шортенингам и спредам необходимо, чтобы они обладали высокой способностью связывать масло. Способность олеогелей удерживать масло после центрифугирования отражает их стабильность и показывает эффективность структурирования [68].

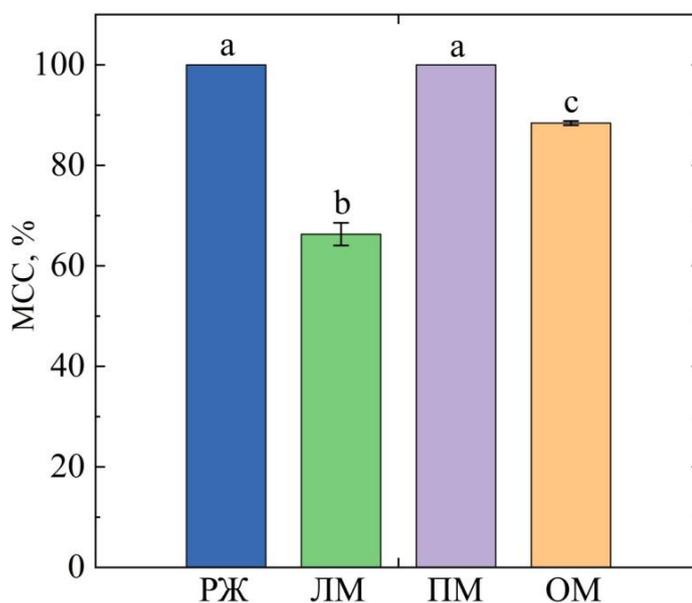


Рисунок 5. Маслосвязывающая способность (МСС) олеогелей на основе различных масел ( $p < 0,05$ )

Высокую МСС (рисунок 5) продемонстрировали образцы олеогелей РЖ ( $100\% \pm 0,0\%$ ), ПМ ( $100\% \pm 0,0\%$ ) и ОМ ( $88,4\% \pm 2,5\%$ ), что может быть связано с визуально более компактной сетью кристаллов, представленных на рисунке 4, которая как было сказано ранее, может оказывать влияние на способность к связыванию масла [52]. Согласно работе [67] маслосвязывающая способность может коррелировать со значением фрактальной размерности, что подтверждается в нашей работе, где  $R^2 = 0,7988$  для показателей маслосвязывающей способности и фрактальной размерности и  $R^2 = 0,8308$  для показателей маслосвязывающей способности и лакуарности. Результаты низкой потери масла олеогелей основанных на растительных [33,59] и животных маслах [69] структурированных пчелиным воском согласуются с ранними исследованиями, объясняющих это в том числе отличиями в форме и размере кристаллов в образующихся олеогелях [52]. Для олеогелей на основе ЛМ была характерна самая низкая МСС (менее 70%), что может быть связано с формой кристаллов схожей со сферолитической, которая согласно работе [66] не способствует удержанию большого количества масла. Согласно работе [70] при варьировании соотношением отдельных компонентов в олеогелях, значения потерь масла могут претерпевать существенные изменения. На основании этого, можно предположить, что низкая МСС могла быть связана с определенным соотношением жирных кислот льняного масла в олеогелей. Другим возможным вариантом низкой маслосвязывающей способности льняных олеогелей может быть наличие различных примесей, в составе масел. Для решения подобной проблемы должны использоваться либо масла без примесей, либо применяться дополнительные компоненты в составе олеогелей. Одним из таких компонентов может быть лецитин, добавляемый в состав олеогелей, который способен изменять морфологию кристаллов и придавать дополнительное усиление сети, тем самым уменьшая потери масла [20, 52]. Ранее при описании полярности говорилось о примесях – полярных веществах нелипидной природы.

### 3.3.3. Определение текстурных свойств

Текстуру исследуемых образцов олеогелей характеризовали с помощью показателей твердость, модуль упругости (E) (модуль Юнга)) и предел текучести (YV).

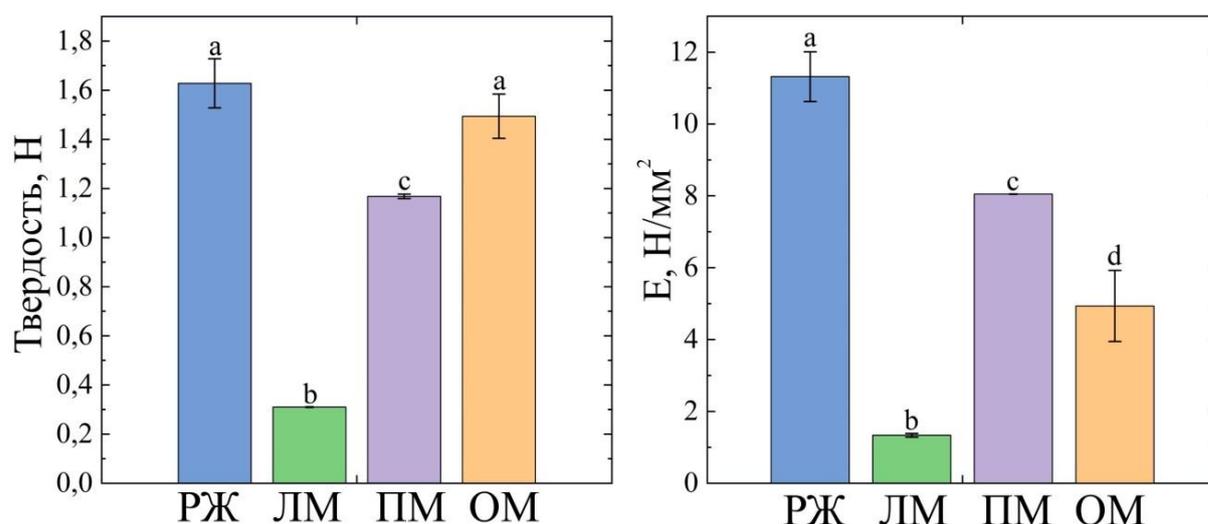


Рисунок 6. Текстурные свойства олеогелей, полученных на различных маслах ( $p < 0,05$ )

Так как для всех образцов был использован единый гелеобразователь – пчелиный воск, то отличия в текстурных свойствах могли быть вызваны именно разнообразием жирнокислотного состава масел, используемых в качестве дисперсионной среды [52]. Согласно работе [71] если твердость можно измерить для всех образцов, это показывает, что они обладают твердоподобными свойствами. В результате исследований (рисунок 6) установлено, что твердость для образцов РЖ составляет ( $1,63 \text{ Н} \pm 0,11 \text{ Н}$ ), чуть ниже показатель у образца ОМ ( $1,49 \text{ Н} \pm 0,10 \text{ Н}$ ), ПМ ( $1,17 \text{ Н} \pm 0,01 \text{ Н}$ ) и самые низкие значения представлены в образце ЛМ ( $0,31 \text{ Н} \pm 0,01 \text{ Н}$ ). Высокие показатели твердости считаются желательным свойством олеогеля, поскольку это дает возможность использовать меньшее количество гелеобразователя для достижения аналогичных твердым жирам реологических характеристик без значительного влияния на органолептические показатели готового продукта. Значения модуля упругости

несколько отличались, но самым высоким значением аналогично твердости, обладал олеогель РЖ ( $11,31 \text{ Н/мм}^2 \pm 0,69 \text{ Н/мм}^2$ ), самым низким значением - олеогель ЛМ ( $1,33 \text{ Н/мм}^2 \pm 0,05 \text{ Н/мм}^2$ ). Высокие показатели твердости, но низкие показатели модуля упругости у образца ОМ говорят, что образец является схожим по прочности с олеогелем РЖ, но при этом является менее пластичным. Результаты определения предела текучести показано в таблице 5.

Таблица 5. Значение предела текучести (YV) для исследуемых олеогелей и их классификация

Тип масла в олеогеле	YV ( $\text{Нм}^{-2} \times 10^2$ )	Оценка
РЖ	$349,0 \pm 2,3^a$	Удовлетворительно пластичный, намазываемый
ЛМ	$66,8 \pm 7,3^b$	Очень мягкий, растекающийся
ПМ	$250,5 \pm 2,7^c$	Удовлетворительно пластичный, намазываемый
ОМ	$320,3 \pm 1,5^d$	Удовлетворительно пластичный, намазываемый

Буквами а, b, с и d показаны статистические отличия образцов друг от друга ( $p < 0,05$ )

Согласно классификации, описанной в работе [42] и полученным показателям YV (таблица 5), текстуру трех образцов олеогелей на основе РЖ, ПМ и ОМ можно классифицировать как «Удовлетворительно пластичный, намазываемый», а олеогелей ЛМ как «Очень мягкий, растекающийся». В частности данная характеристика может быть полезна при выборе олеогеля с целью замены твердого жира в пищевых продуктах с учетом индивидуальных характеристик готовой пищевой продукции [52]. При анализе результатов микроскопии, где средний размер кристаллов уменьшается в ряду ЛМ > ПМ > ОМ > РЖ, и показателей твердости, то олеогели с более мелкими кристаллами образуют более прочные гели, что также подтверждается заключением выдвинутом в [72] о влиянии размера кристаллов на текстурные свойства олеогелей. По нашему мнению эта закономерность может быть связана с большей площадью

поверхности в кристаллах мелких размеров [52]. Вероятно, на морфологические особенности кристаллов влияют отдельные жирные кислоты или полярные компоненты, присутствующие в маслах, тем самым изменяя текстурные свойства олеогелей. Так, в работе [73] указано о существенном влиянии полярных компонентов на структуру сетки олеогеля, что в свою очередь ведет к существенным изменениям свойств олеогелей, в том числе текстурным. Стоит отметить, что, несмотря на различия в твердости олеогелей, они все могут быть рекомендованы в качестве замены твердым жирам, так как в составе пищевых продуктах могут использоваться шортенинги и маргарины, обладающие различными текстурными свойствами [52].

### **3.3.4 ИК-спектроскопия с преобразование Фурье**

Для оценки влияния типа масла на кристаллизацию пчелиного воска в олеогеле была использована FTIR-спектроскопия (рисунок 7). Были получены спектры всех образцов масел и олеогелей на их основе. В ИК-спектре олеогелей можно выделить две области:  $3100-2800\text{ см}^{-1}$  и  $1800-800\text{ см}^{-1}$ . Первая область включает колебания неполярных алифатических групп, вторая - колебания карбонильной группы ( $1750\text{ см}^{-1}$ ), а также область отпечатков, характеризующую деформационные и скелетные колебания многоатомных систем. Статистически значимые изменения в положении полос поглощения были выявлены только для колебаний неполярных алифатических групп.

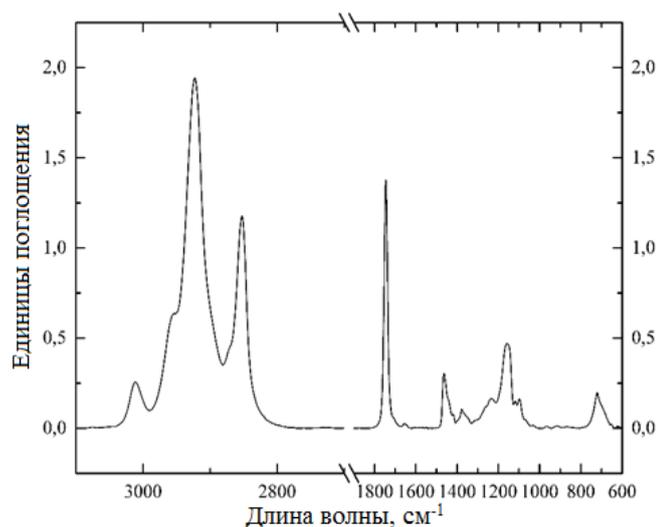


Рисунок 7. Характерные ИК-Фурье спектры олеогеля (в качестве примера показан гель на основе рыбьего жира).

Были изучены положения полос поглощения основных функциональных групп в масле, а также сдвиг ( $d$ ) этих полос при образовании геля (рисунок 8).

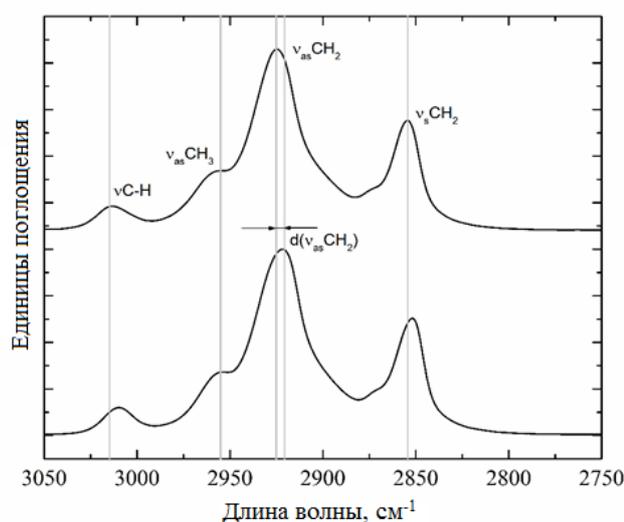


Рисунок 8. Иллюстрация принципа расчета разности волновых полос ( $\nu$ СН – СН растягивающее колебание алкенов,  $\nu_{as}$ СН<sub>3</sub> – асимметричное растягивающее колебание группы СН<sub>3</sub>,  $\nu_{as}$ СН<sub>2</sub> – асимметричное растягивающее колебание группы СН<sub>2</sub>,  $\nu_s$ СН<sub>2</sub> – симметричное растягивающее колебание группы СН<sub>2</sub> и  $d(\nu_{as}$ СН<sub>2</sub>) – внутриспектральная разность).

Статистически значимые (достоверные) сдвиги были обнаружены только для полос поглощения С-Н растяжения алкенов ( $\nu$ С-Н) при 3005-3011  $\text{см}^{-1}$ , СН<sub>3</sub> асимметричного растягивающего колебания ( $\nu_{as}$ СН<sub>3</sub>) при 2953  $\text{см}^{-1}$ , СН<sub>2</sub>

асимметричного растягивающего колебания ( $\nu_{as}CH_2$ ) при 2920-2925  $cm^{-1}$  и  $CH_2$  симметричного растягивающего колебания ( $\nu_sCH_2$ ) при 2851-2854  $cm^{-1}$  (рисунок 8). Отсутствие значительных изменений в полосах поглощения полярных групп указывает на то, что их колебания не чувствительны к каким-либо конформационным изменениям в процессе структурирования пчелиным воском [52]. Положения полос поглощения для исследованных образцов приведены в (табл. 6) и соответствуют ожидаемым положениям полос поглощения для липидов.

Таблица 6. Результаты анализа ИК-Фурье спектров масла и соответствующих олеогелей

Масло	Состояние	Позиция связи, $cm^{-1}$			
		$\nu_{C-H}$	$\nu_{as}CH_3$	$\nu_{as}CH_2$	$\nu_sCH_2$
Подсолнечное	Масло	3008,938	2953,522	2924,939	2854,452
	Гель	3009,08	2953,589	2920,267	2851,151
	d(v)	0,1423	0,0662	-4,672	-3,3008
Рыбий жир	Масло	3011,328	2953,151	2924,427	2853,931
	Гель	3011,465	2953,003	2922,849	2852,524
	d(v)	0,1363	-0,1481	-1,5778	-1,4072
Льняное	Масло	3009,586	2953,671	2925,178	2854,447
	Гель	3009,637	2953,871	2923,337	2852,847
	d(v)	0,0512	0,2003	-1,8411	-1,5997
Оливковое	Масло	3005,632	2953,605	2924,073	2853,96
	Гель	3005,573	2953,404	2921,91	2852,114
	d(v)	-0,0588	-0,2015	-2,1633	-1,8465

d(v) – разница между положением связи в геле и в масле

Наибольшие изменения в положении полос поглощения характерны для колебаний  $\nu_{as}CH_2$  и  $\nu_sCH_2$ . Во всех случаях эти полосы смещались в сторону более низких номеров волн, что свидетельствует о снижении колебательной энергии этих связей и образовании более упорядоченных структур углеводородной цепи.

Наибольший сдвиг этих полос поглощения наблюдался для олеогеля на основе ПМ и составил  $-4,672 \text{ см}^{-1}$  и  $-3,301 \text{ см}^{-1}$ , соответственно. Наименьший сдвиг характерен для олеогелей на основе РЖ и составляет  $-4,672 \text{ см}^{-1}$  и  $-3,301 \text{ см}^{-1}$ , соответственно. Для всех образцов характерно большее смещение асимметричной полосы поглощения по сравнению с симметричной. Значительно меньшие, но статистически значимые изменения в положении полос поглощения  $\nu_{\text{C-H}}$  и  $\nu_{\text{asCH}_3}$ . Пики качающихся колебаний  $\text{CH}_2$  ( $722 \text{ см}^{-1}$ ) и изгибов  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}_3$  (оба при  $1461 \text{ см}^{-1}$ ) всех образцов не разделены, что характерно для гексагональной и триклинной, но не орторомбической упаковки [74]. Отсутствие орторомбических кристаллов также подтверждается результатами поляризационной световой микроскопии (рисунок 4) [75].

### 3.3.5. Исследование термических характеристик

Температуры плавления и кристаллизации являются важным качественным свойством жиров, которые определяют область их применения. Термическое поведение олеогелей на основе масел с различным жирнокислотным составом (таблица 2) были охарактеризованы с помощью DSC, как показано на рисунке 9 и в таблице 7.

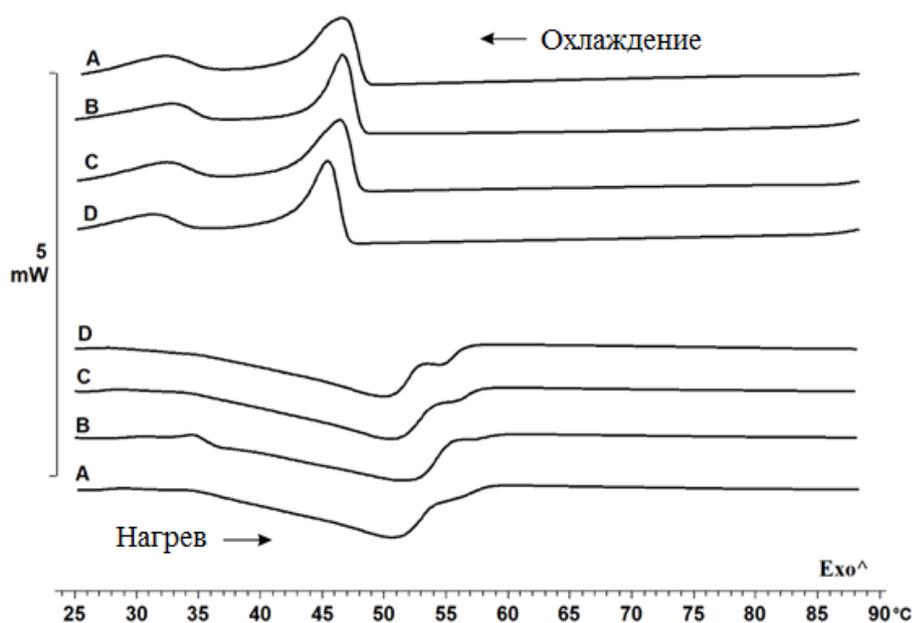


Рисунок 9. Термограммы нагревания и охлаждения олеогелей (А – олеогель на рыбьем жире, В – олеогель на льняном масле, С – олеогель на подсолнечном масле, D – олеогель на оливковом масле)

Температура начала кристаллизации варьировалась следующим образом  $ОМ < ПМ < ЛМ < РЖ$ . Температура плавления имела незначительные отличия  $ОМ < ПМ < РЖ < ЛМ$ . В целом, существенных различий в положении пиков олеогелей не обнаружено, поэтому можно заключить об отсутствии достоверного влияния жирно-кислотного состава масел.

Таблица 7. Термические характеристики олеогелей

Образец	Нагрев			Охлаждение		
	Tonset	Tm	$\Delta H_m$	Tonset	Tc	$\Delta H_c$
РЖ	$36,8 \pm 0,4$	$50,7 \pm 0,6$	$-6,4 \pm 0,5$	$48,5 \pm 0,1$	$46,5 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,4$
ЛМ	$34,8 \pm 0,1$	$51,7 \pm 0,9$	$-6,3 \pm 0,6$	$48,2 \pm 0,0$	$46,5 \pm 0,0$	$4,2 \pm 0,2$
ПМ	$36,2 \pm 0,3$	$50,5 \pm 0,3$	$-6,4 \pm 0,3$	$48,0 \pm 0,1$	$46,5 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,5$
ОМ	$36,1 \pm 0,3$	$50,2 \pm 0,2$	$-6,2 \pm 0,2$	$47,0 \pm 0,2$	$45,4 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,3$

Температура плавления – Tm; энтальпия плавления –  $\Delta H_m$ ; температура кристаллизации – Tc; энтальпия кристаллизации –  $\Delta H_c$ , температура начала плавления или кристаллизации – Tonset

Отсутствие изменений в пиках плавления и кристаллизации между образцами согласуется с работой [76], в которой были получены схожие термограммы олеогелей на основе растительных масел и показано, что термическая кривая в значительной степени зависит от концентрации и типа гелеобразователя, независимо от масляной фазы. При этом, в нашем исследовании был обнаружен дополнительный пик плавления в районе 37°C на термограмме олеогелей ЛМ, что может быть признаком образования двух типов кристаллов (рис 4b). Все используемые масла содержали большое количество ненасыщенных жирных кислот, однако олеогели на их основе обладали высокими температурами плавления, превышающими температуры плавления некоторых животных жиров, например свиного жира [52, 77]. Из-за высоких температур плавления, данные олеогели должны быть использованы для определенных типов продукта, в которых требуются жиры такого типа [52].

### **3.4. Корреляционный анализ**

Для обобщения полученных данных и выявления общих закономерностей для олеогелей на основе пчелиного воска и различных пищевых масел был проведен корреляционный анализ данных и построена тепловая карта для всех полученных значений. На рисунке 10 показано, что исследуемые индикаторы можно разделить на несколько групп в зависимости от их коэффициента корреляции.

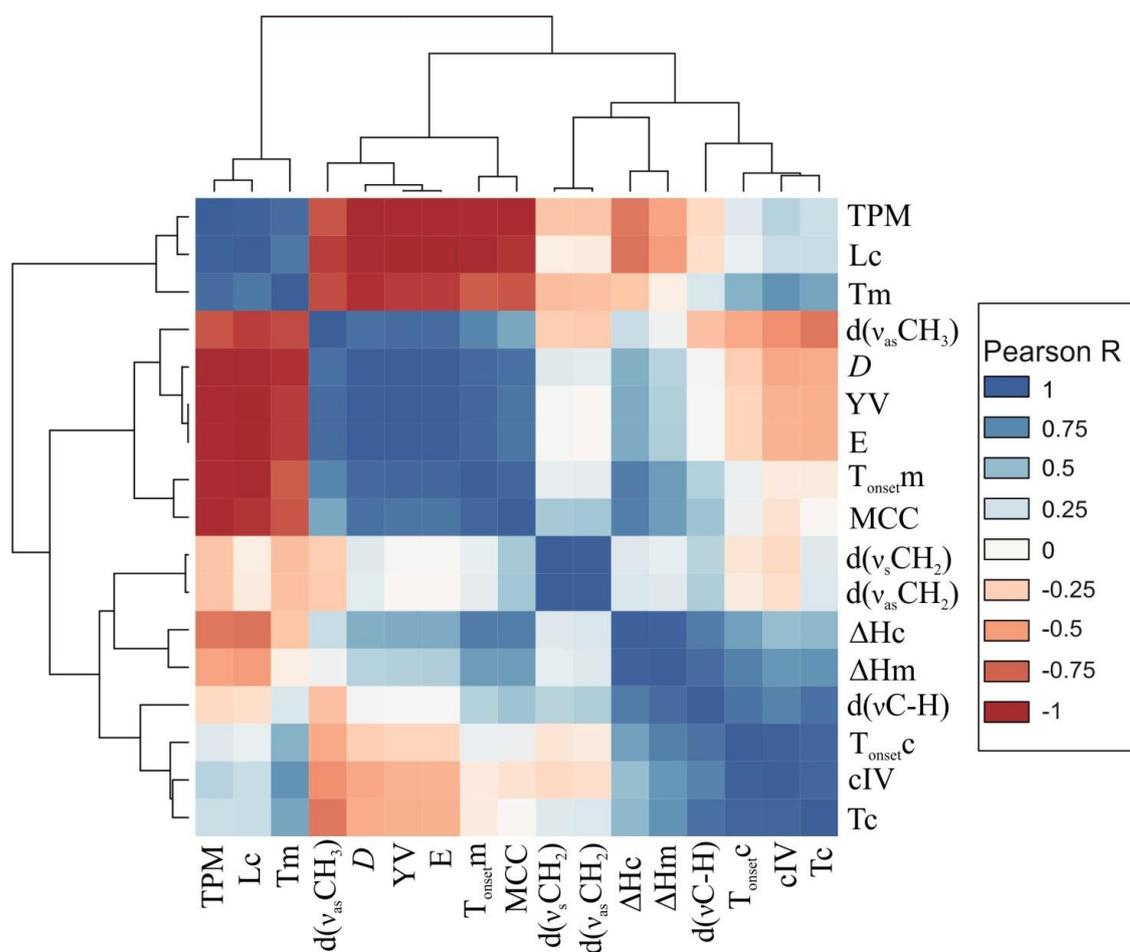


Рисунок 10. Корреляционный анализ основных параметров (положительные корреляции показаны синим цветом, отрицательные – красным).  $d(vC-H)$  и  $d(vsCH_2)$  – внутриспектральная разность симметричного растягивающего колебания групп  $CH$  и  $CH_2$  соответственно,  $d(vasCH_2)$  и  $d(vasCH_3)$  – внутриспектральная разность асимметричного растягивающего колебания группы  $CH_2$  и  $CH_3$

Прежде всего, следует отметить, что значения сдвигов полос поглощения для связей  $vasCH_2$  и  $vsCH_2$  находятся лишь в тесной корреляции друг с другом. В связи с этим можно сделать вывод, что тип масла в олеогеле пчелиного воска не связан с изменением вибрационных характеристик углеводородной цепи молекул пчелиного воска при кристаллизации [52]. Отсутствие изменений в пиках плавления и кристаллизации между образцами согласуется с работой [76], в которой были получены аналогичные термограммы олеогелей на основе растительных масел и показано, что термическая кривая в значительной степени

зависит от концентрации и типа гелеобразователя, независимо от масляной фазы. ТРМ, размер кристаллов и  $T_m$  можно выделить в отдельные кластеры с тесной положительной корреляцией друг с другом. Таким образом, увеличение полярности масла связано с увеличением температуры плавления и размера кристаллов в олеогелях. В свою очередь, увеличение этих величин связано с уменьшением прочностных параметров ( $YV$ ,  $E$ ) и связывания масла [52]. Отрицательная корреляция между размером кристаллов парафинового олеогеля и его прочностью была показана в различных исследованиях ранее [78] и является ожидаемым результатом. Однако, согласно литературным данным, увеличение значения ТРМ должно увеличивать прочность олеогеля. Возможным объяснением расхождения наших данных с ранее полученными может быть то, что метод определения ТРМ неспецифичен. В эксперименте [32] содержание полярных веществ увеличивали путем добавления в масло свободных жирных кислот, которые сами по себе являются эффективными гелеобразователями. В нашем исследовании высокие значения полярных веществ могли быть связаны как с природой масла [79], так и с присутствием нелипидных примесей [63], которые не являются гелеобразователями и потенциально могут разрушать структуру олеогеля [52]. Значение  $T_m$  имеет тесную положительную корреляцию с  $cIV$ , то есть степенью ненасыщенности масла. Также показано, что значения  $T_c$  и  $T_{onset}$  тесно коррелируют с  $cIV$ . Прочностные характеристики олеогеля на основе пчелиного воска находятся в тесной положительной корреляции с маслосвязывающей способностью. Значительные корреляции с этими показателями наблюдаются для фрактальной размерности ( $D$ ) и температуры начала плавления ( $T_{onset,m}$ ) [52]. Кроме того,  $\Delta H_c$  тесно коррелирует с маслосвязывающей способностью.

В результате проведенных исследований показано, что тип масла не влияет на колебательные характеристики метильных групп углеводородной цепи веществ в составе пчелиного воска, но гелеобразование приводит к схожим изменениям во всех маслах. Показана взаимосвязь между размером кристаллов олеогеля, содержанием общих полярных веществ и показателями механической

прочности и стабильности олеогеля [52]. Результаты проведенных работ свидетельствуют о том, что для получения наиболее устойчивых олеогелей на основе пчелиного воска необходимо использовать масла с наименьшим содержанием полярных веществ. Также выявлена взаимосвязь между йодным числом и термическими характеристиками олеогелей, в частности с температурой плавления и кристаллизации. Полученные сведения могут послужить основой для целенаправленной коррекции свойств пищевых олеогелей для разных типов пищевых продуктов. Так, продукты, требующие использование олеогелей с низкими механическими характеристиками, целесообразно вырабатывать на сочетаниях масел с высоким содержанием полярных веществ, при этом обеспечивать высокую температуру плавления за счет снижения йодного числа. И, наоборот, при высоких значениях йодного числа возможно повышение механических характеристик олеогелей за счет снижения содержания полярных веществ [52].

## **ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ПЧЕЛИНОГО ВОСКА, АНАЛИЗ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ФРАКЦИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ГЕЛЕОБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ**

Материалы, опубликованные в данном разделе представлены в исследованиях [50,80–83].

Воски характеризуются существенными различиями композиционного состава, что ранее было показано в главе 1, таблица 1. Например, подсолнечный воск в основном содержит в своем составе сложные восковые эфиры (68–96%). Канделильский воск характеризуется высоким содержанием углеводов (50–51%), а также имеет в своем составе до 29% восковых эфиров и 7–9% свободных жирных кислот. В составе пчелиного воска обычно содержится около 14–27 % углеводов, от 58 до 67% восковых эфиров, от 8 до 12% свободных жирных кислот, от 1 до 7% свободных жирных спиртов, а также смол и других веществ. В связи с ограниченностью одобренных к применению в пищевой промышленности восков может быть полезен подход, связанный с фракционированием восков (из списка разрешенных) для извлечения его отдельных компонентов и поиск оптимального состава для целей структурирования жидких пищевых масел. При этом автором [2] при построении корреляционного анализа между химическим составом восков и их гелеобразующими свойствами выявлена ключевая роль углеводов и жирных кислот в консистенции и стабильности восковых олеогелей. Для изучения гелеобразующих свойств отдельных фракций, входящих в составе восков в нашей работе, на первом этапе был проведен скрининг литературных данных (глава 1) для поиска оптимального объекта исследования, согласно которому показано, что пчелиный воск является основным претендентом на фракционирование с использованием экстракционных растворителей, разрешенных для экстракции в пищевой промышленности. В связи с тем, что на данный момент отсутствуют сведения о возможности фракционирования пчелиного воска с помощью препаративной жидкостной

флеш-хроматографии, одна из задач исследования заключалась в разработке соответствующего метода фракционирования, всесторонний анализ полученных фракций пчелиного воска и дальнейшая оценка их гелеобразующих свойств при структурировании жидкого пищевого масла.

#### **4.1 Разработка метода фракционирования пчелиного воска**

Разделение пчелиного воска (ПВ) на отдельные фракции осуществлялось при помощи препаративного флеш-хроматографа Biotage Isolera Prime (Biotage, Sweden) оснащенного ультрафиолетовым детектором согласно рекомендациям [84]. Выбор элюента основывался на работе [28]. Изначально был подобран растворитель для загрузки пчелиного воска в колонку с подбором наименее полярной смеси гексана и ацетона, в которых пчелиный воск полностью растворится. Были исследованы следующие соотношения гексан:ацетона 100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 91:9, 90:10 об/об. Образцы воска ( $1,00 \pm 0,01$  г) помещались в стеклянные пробирки с 4 мл каждого растворителя и закрывались крышкой. Затем пробирки обрабатывали в ультразвуковой ванне при  $50^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин или до полного растворения воска. После чего пробирки выдерживали при комнатной температуре в течение 24 часов, выпадение осадка контролировали визуально. Было показано, что в этих условиях пчелиный воск может полностью растворяться в системе гексан: ацетон, содержащей 4–6% ацетона. В других системах образовывался осадок. Соотношение гексан: ацетон (96:4) имело наименьшую возможную полярность среди смесей, в которых воск способен раствориться, поэтому выбор был сделан именно на ней. Процедура оптимизации градиента была проведена путем применения картриджа Biotage SNAP 50 г (размеры:  $39 \times 81$  мм, объем колонки 66 мл) с силикагелем нормальной фазы (размер частиц 45–50 мкм) (Biotage). Этот размер колонки имеет допустимую нагрузку от 0,5 до 2,5 г. Для приготовления пробы был использован 1 г пчелиного воска, который растворяли в 4 мл смеси гексан-ацетон (96:4) при

нагревании до 50 °С. После чего к полученному раствору добавляли 3г силикагеля. Итоговое соотношение воск-растворитель-силикагель было равно 1:4:3. Полученную смесь высушивали на роторном испарителе при 60°С до состояния сухого сыпучего порошка. Затем порошок загружали в колонку с использованием метода внешней сухой загрузки в пустую емкость (DLV 070, Biotage). В качестве подвижной фазы использовали следующие растворители: гексан (А), гексан–ацетон (90:10 об./об.) (В) описанных ранее, а также изопропиловый спирт (С). Изопропиловый спирт был использован для элюирования наиболее полярных компонентов в составе пчелиного воска. Данные элюенты и их необходимые концентрации были подобраны путем расчета  $R_f$  при помощи тонкослойной хроматографии (данные не представлены). Перед каждым циклом разделения систему уравнивали двумя объемами колонки (CV) растворителя А. Общее количество использованного элюента было равно 12 CV. В процессе разделения скорость потока элюента составляла 15 мл/мин, рекомендованного системой хроматографа для колонок данного объема. Впоследствии количество фракционируемого воска было увеличено, путем использования картриджа Biotage SNAP 340 г. (размеры: 71 × 168 мм, объем колонки 470 мл) с силикагелем нормальной фазы (размер частиц 45–50 мкм). Этот размер колонки имеет возможность загрузки от 3,4 до 17 г вещества. Все параметры были пропорционально масштабированы с маленькой колонки. Образец пчелиного воска (10 г) растворяли в 40 мл смеси гексан-ацетон (96:4), после чего к полученному раствору добавляли 30 г силикагеля. Во время разделения, скорость потока элюента составляла 50 мл/мин, градиент автоматически преобразован в следующие значения: 100% А - 3 CV, 30% В - 6 CV, 40% В - 2 CV, От 40% В до 100% В - 2 CV, 100% В - 1 CV, 100% В до 25% В и 75% С - 1 CV, 75% С - 3 CV. В результате фракционирования были получены несколько фракций, которые были обозначены буквой «F». Процесс разделения контролировали при 2 длинах волн: 205 и 280 нм. Первая длина волны была выбрана для неспецифического мониторинга хромофоров с полосой поглощения выше порога обнаружения гексана (201 нм). Вторая длина волны была выбрана

как наиболее общая длина волны для фенольных соединений, которая может быть в воске [85]. Компоненты пчелиного воска в основном не обладают большим количеством хромофоров [86], поэтому большая часть характеризуется слабым обнаружением на УФ-детекторе (Рисунок 11).

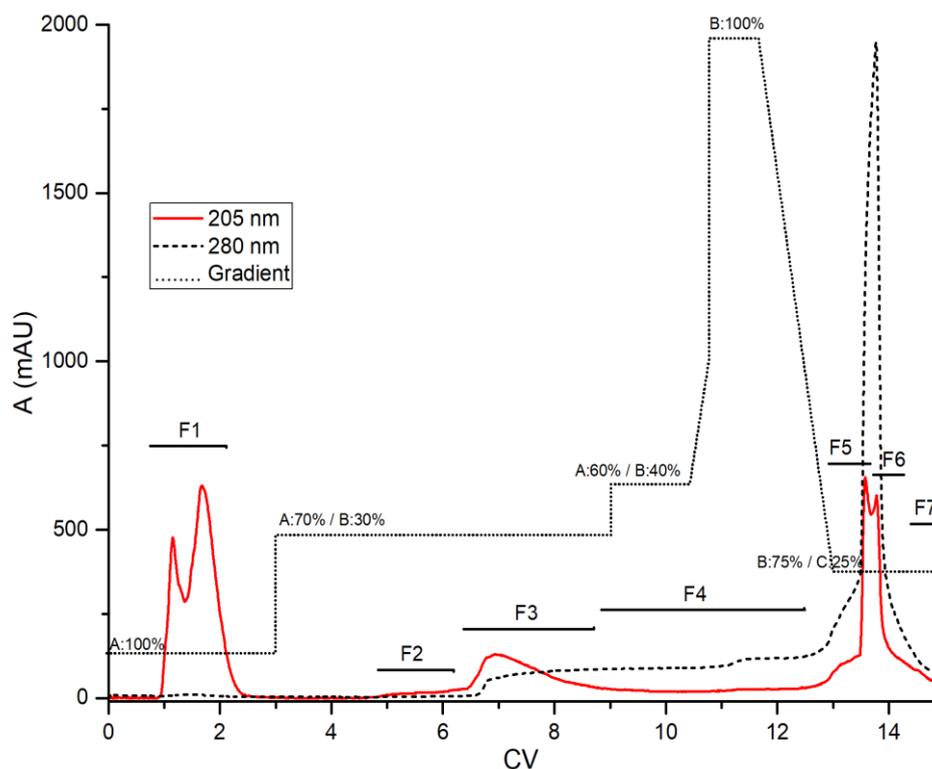


Рисунок 11. Хроматограмма разделения пчелиного воска с помощью препаративного флеш - хроматографа. Красной линией показано поглощение при длине волны 205 нм, черной пунктирной линией поглощение при 280 нм. CV – количество объемов колонки. Градиент растворителя показан сплошной черной линией. Черными полосками с указанием F1-F7 показаны участки выхода фракций

Тем не менее, полученные пики хорошо различимы визуально и легко идентифицируются с помощью коллектора фракций с порогом обнаружения, установленным на 40 mAU. Как видно на рисунке 11, первая группа веществ легко элюируется растворителем А (обозначенных как фракция F1). Этот указывает на то, что эти соединения имеют самое низкое сродство к неподвижной фазе, например углеводороды. Они обнаружены только на 205 нм (красная сплошная линия), что указывает на возможное наличие карбоновых кислот и

сложных эфиров. Следующая группа более полярных веществ элюируется после добавления 30% растворителя В и собираемые во фракцию F2. Компоненты этой фракции видны со слабым поглощением при 205 нм. Эта группа веществ также не видна при 280 нм (черная пунктирная линия). На этом этапе могут быть элюированы эфиры воска. Обычно после 3–4 объемов колонки (CV) элюируются вещества, видимые при 280 нм, среди них кетоны, альдегиды, и фенолы. Фракцию F3 отбирали, начиная с момента увеличения поглощения при 205 нм. Фракция F4 включает вещества, элюированные из хвоста фракции F3. Появление узкого пика с максимумом поглощения при 280 нм наблюдается после добавления изопропилового спирта. Этот пик разделен на две половины (F5 и F6 фракций) по поглощению при 205 нм. Выход фракций после экстракции варьировался от 93% до 95%, что соответствует значениям, указанным в [87]. Фракции F3 – F7, вероятно, представляют собой смеси восковых эфиров, свободных жирных кислот и спиртов, а также фенольных соединений. Полученные фракции были охарактеризованы с помощью тонкослойной хроматографией, ИК-Фурье-спектроскопией и ВЭЖХ с детектором светорассеивания, световой поляризационной микроскопией, дифференциально-сканирующей калориметрией, проведен анализ летучих органических веществ.

## **4.2. Характеристика фракций пчелиного воска**

### **4.2.1. Внешний вид**

Как видно из рисунка 12, собранные и выпаренные фракции отличаются по внешнему виду от прозрачно-белого цвета фракции F1 до светло-коричневого цвета фракции F6. Фракция F7 характеризовалась коричневым цветом.



Рисунок 12. Внешний вид выделенных фракций F1-F6

Существует тенденция, что фракции с более низким сродством (элюированные раньше) к неподвижной фазе имеют более светлый цвет, чем фракции с более высоким сродством (элюированные позже) в пределах цветов, общих для пчелиного воска (от прозрачно-белого до светло-коричневого). Субъективная оценка запаха фракций выявила некоторые различия: фракции F1 и F2 имели слабый невыраженный запах, в то время как другие фракции имели более специфический резкий запах.

#### 4.2.2 Идентификация компонентного состава

Качественный анализ ПВ и его фракций осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии. Результаты анализа приведены на рисунке 13.

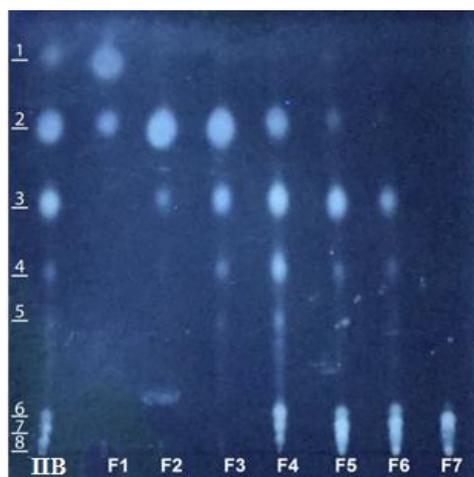


Рисунок 13. Тонкослойная хроматография пчелиного воска (ПВ) и его отдельных фракций

Как видно, новых пятен по сравнению с пчелиным воском нет. Таким образом можно сказать, что процесс флеш-хроматографии не вызвал потери существующих соединений и не привел к формированию новых. Согласно литературным данным [25], и расчету времени выхода соединений ( $R_f$ ) можно предположить наличие углеводородов ( $R_f = 0,89$ ), моноэфиров ( $R_f = 0,71$ ), диэфиров ( $R_f = 0,53$ ), триэфиров ( $R_f = 0,41$ ), жирных спиртов ( $R_f = 0,30$ ), гидроксимоноэфиров ( $R_f = 0,07$ ), гидроксиполиэфиров ( $R_f = 0,04$ ) и свободных жирных кислот ( $R_f = 0,03$ ). Таким образом, фракция F1 состоит в основном углеводородов и незначительного количества моноэфиров. Фракция F2 в основном состоит из моноэфиров, фракция F3 - моно-, ди-, триэфиров и незначительного количества более полярных веществ, фракция F4 - в основном из веществ с  $R_f < 0,35$ , а также небольшого количества моно-, ди- и триэфиров, F5 - преимущественно из гидроксимоноэфиров, гидроксиполиэфиров и свободных жирных кислот, а также следов моно-, ди- и триэфиров. F6 - аналог F5, но с меньшим содержанием гидроксимоноэфиров, F7 - из свободных жирных кислот и гидроксиполиэфиров. Результаты анализа тонкослойной хроматографии подтверждаются ИК-Фурье спектроскопией (рисунок 14).

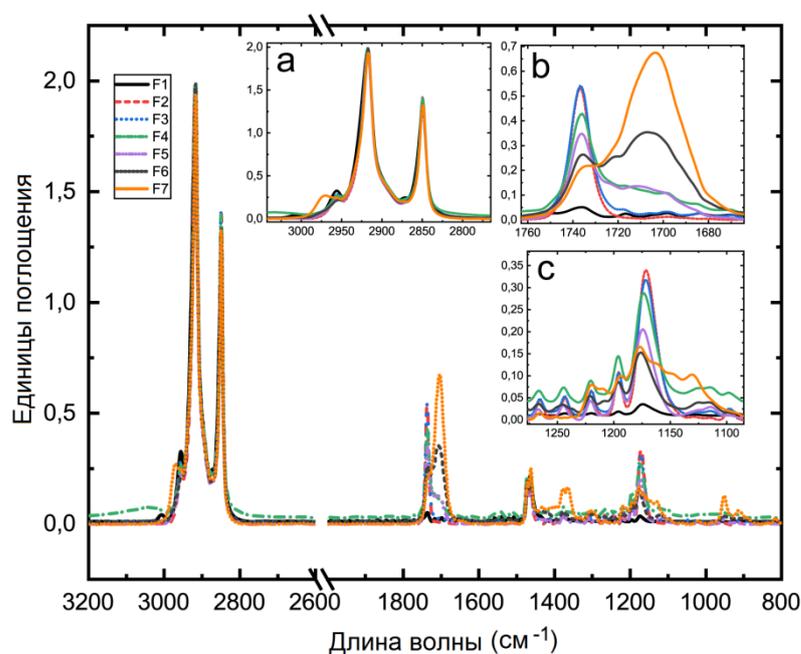


Рисунок 14. ИК-Фурье спектроскопия фракций пчелиного воска

Как видно на рисунке, есть существенные различия в спектрах поглощения между образцами. В частности, в области поглощения функциональной группы –СНЗ, а также симметричных и асимметричных колебаний СН<sub>2</sub>-групп (рисунок 14а). Показано, что полоса поглощения концевых –СН<sub>3</sub> групп для F7 значительно смещена в сторону более коротких волн, что может быть связано с участием этих групп в межмолекулярных взаимодействиях [88]. Фракция F5 имеет дополнительные полосы поглощения в области выше 3000 см<sup>-1</sup>, что указывает на наличие ОН-групп. Наиболее существенные отличия были отмечены в поглощении карбонильных СО-групп сложных эфиров и свободных жирных кислот (рисунок 14b). Показано, что F1 фракция характеризуется практически полным отсутствием поглощения в этой области. Фракции F2 – F7 характеризуются уменьшением интенсивности полосы поглощения при 1740 см<sup>-1</sup> и увеличением на 1700 см<sup>-1</sup>, что указывает на снижение содержания сложных эфиров и увеличением свободных жирных кислот [89]. Похожие изменения были отмечены в области «отпечатков пальцев» на поглощении СО-групп сложных эфиров (рисунок 14c). Результаты количественной оценки химического состава пчелиного воска и его фракций с помощью ВЭЖХ с детектором светорассеивания показаны в таблице 8.

Таблица 8. Результаты анализа пчелиного воска и его фракций с помощью ВЭЖХ с детектором светорассеивания

Химический состав, %	ПВ	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
УВ	13,1	94,8	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ВЭ	62,0	4,5	97,6	98,7	81,5	31,0	7,8	9,4
СЖК	20,5	0,7	1,6	1,3	13,9	29,8	82,6	81,1
СЖС	4,40	0,0	0,0	0,0	4,6	39,3	9,6	9,5

УВ – углеводороды, ВЭ – восковые эфиры, СЖК – свободные жирные кислоты,

СЖС – свободные жирные спирты

Как видно из таблицы 8, используемый пчелиный воск характеризуется высоким содержанием свободных жирных кислот (20,5%). Содержание остальных

фракций нормальное для данного типа воска [25]. Как и ожидалось, фракция F1 состоит в основном из углеводородов. Фракция F2 содержит 97,6% восковых эфиров (в основном моноэфиры по данным ТСХ, рисунок 13). Фракция F3 представляет собой смесь различных восковых эфиров с низким содержанием свободных жирных кислот (до 2%). Фракция F4 содержит только около 80% восковых эфиров и около 14% жирных кислот и небольшое количество жирных спиртов. Максимальное содержание свободных жирных спиртов приходится на фракцию F5 которая содержит около 39% свободных жирных спиртов, что связано с появлением широкой полосы поглощения в ИК-спектре образца в области выше  $3000 \text{ см}^{-1}$ . F6 и F7 фракции имеют схожий состав, характеризуются высоким ( $> 80\%$ ) содержанием свободных жирных кислот. Как и в работе [87] показано, что жидкостная флеш-хроматография более эффективна при фракционировании наименее полярной фракции углеводородов и хуже для более полярных свободных жирных кислот и спиртов.

#### 4.2.3. Определение характерных ароматических соединений

Учитывая, что фракции предназначены для использования в качестве пищевых гелеобразователей, любые посторонние запахи могут оказывать воздействие на органолептические свойства получаемых продуктов. Для определения характерных ароматических компонентов самых отличающихся фракций был использован качественный/полуколичественный анализ (твердофазная микроэкстракция с ГХ-МС в свободном пространстве). Анализ летучих соединений проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 7890A в сочетании с квадрупольным масс - детектором Agilent Technologies 5975C (США). Исходный ПВ и фракция F1 имеют различные профили соединений. В их профилях нет преобладающих компонентов. С другой стороны, фракции F3 – F5 имеют два преобладающих компонента. Например, основной компонент фракции F4 представляет собой 3-гексен-2-он (50,2%) и

форон (27,4%), для фракции F5–3-гексен-2-он (43,0%) и 4-гидрокси-4-метил-2-пентанон (30,4%). Эти компоненты могут приводить к более сильному запаху этих образцов. После сбора профилей и идентификации соединений к этим данным был применен PCA-анализ (рисунок 13).

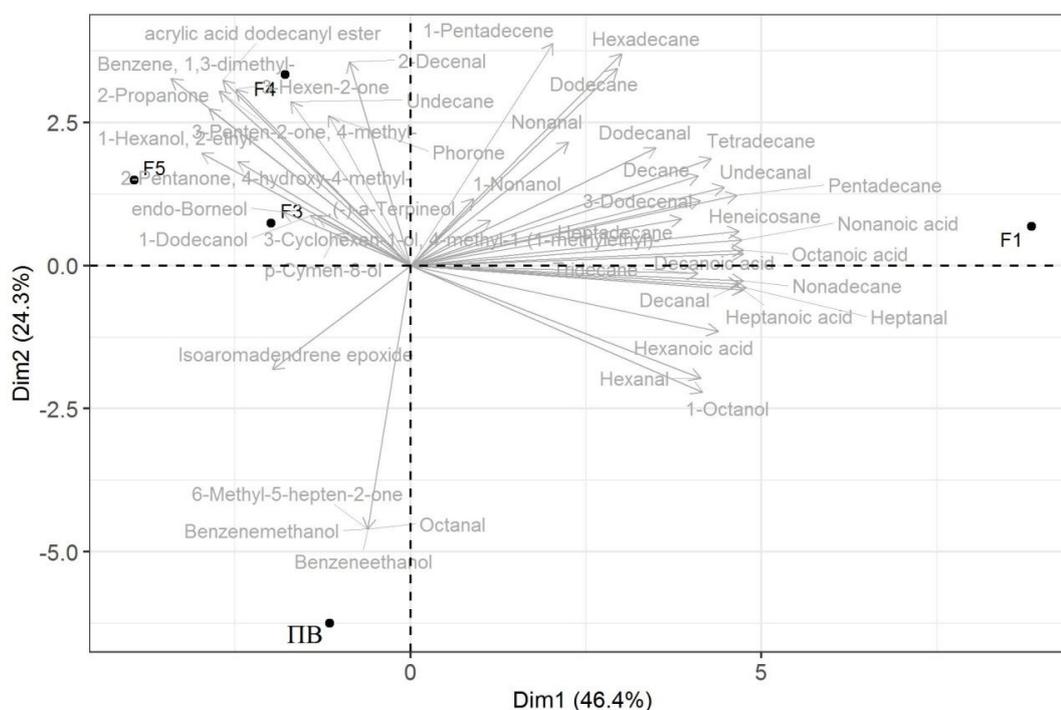


Рисунок 13. Анализ главных компонент (PCA)

Как видно из рисунка 13, первые два измерения характеризуют 70,7% общего разброса между фракциями. Относительные концентрации гептанала, октановой кислоты, наонадекана, гептановой кислоты и декановой кислоты имеют самый высокий вклад (положительная корреляция) в первое измерение. Запах этих соединений обычно идентифицируется как «восковый», «свежий», «жирный» и «мягкий». Это измерение также отрицательно коррелирует с относительной концентрацией 1,3-диметилбензола, 2-пропанона (ацетон), и 4-метил-3-пентен-2-она. Запах этих компонентов характеризуется такими дескрипторами как: «растворитель», «резкий», и «землистый». Относительные концентрации октанала, 6-метил-5-гептен-2-она, бензолметанола и бензолэтанола имеют наибольший вклад (отрицательная корреляция) ко второму измерению. Запах этих компонентов характеризуется «цветочными», «альдегидными»,

«розовыми», «цитрусовыми» дескрипторами. Это измерение положительно коррелирует с относительной концентрацией 1-пентадецена, 2-деценаля, 2-пропанола и 4-метил-3-пентен-2-ола. Запах этих соединений характеризуется как «резкий», «растворитель» и «землистый». Исходный ПВ отрицательно коррелирует со вторым измерением - и характеризуется в основном дескрипторами «цветочный», «альдегидный», «розовый» и «цитрусовый». Фракция F1 имеет высокую корреляцию с первым измерением. Его изменчивый профиль соединений в основном характеризуется наличием углеводов и жирных кислот. Вещества, входящие в эту фракцию в основном характеризуются следующими дескрипторами: «восковый», «свежий», «жирный» и «мягкий». Фракции F3, F4 и F5 отрицательно коррелируют с первым измерением и положительно со вторым измерением, тем самым они в основном характеризуются как «резкий», «растворитель» и «землистый». Дескриптор «растворитель» возможно, связан с наличием ацетона, который может быть остатком элюента или ацетон от самого пчелиного воска. Как известно, остаточные жидкие растворители могут повлиять на процесс кристаллизации жира, понижая температуры плавления [90]. Учитывая, что ацетон был обнаружен в небольшой концентрации по сравнению с другими летучими соединениями и каждая фракция в качестве гелеобразователя будет использоваться в количестве не более 4–6%, то влияние остатков растворителя на процесс кристаллизации должно быть минимальным. Однако для обеспечения безопасности, перед применением необходимо измерять и контролировать количество остаточных растворителей.

#### 4.2.4 Морфология кристаллов

Как видно на рисунок 14, исходный ПВ образовывал специфические кристаллы, которые при таком увеличении обычно характеризуются как игольчатые.

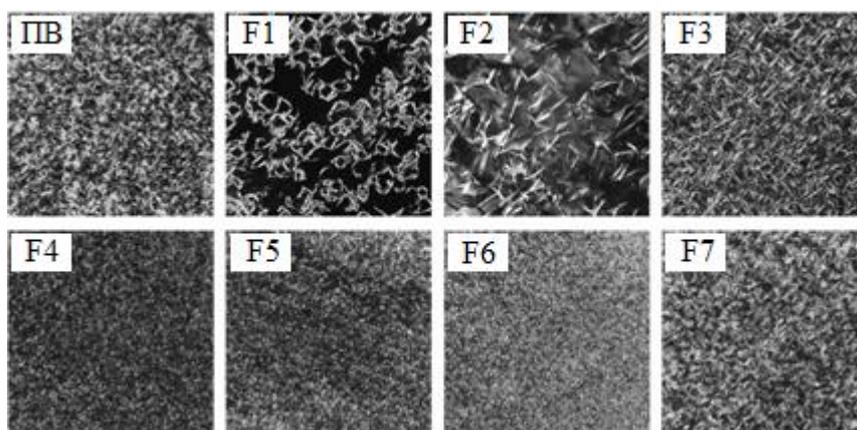


Рисунок 14. Микроскопия пчелиного воска и его фракций

Фракция F1, состоящая в основном из углеводов, имеет изогнутые кристаллы неправильной формы. Фракции F2 – F7 образует кристаллы по форме, близкой к форме кристаллов пчелиного воска. Наибольший размер кристаллов выявлен у фракции F2, состоящей в основном из сложных восковых моноэфиров. Размер кристаллов F3 (смесь моно-, ди- и триэфиров) меньше, чем у F2, и больше, чем у кристаллов пчелиного воска. Размер кристаллов F4, F5, F6 и F7 значительно меньше, чем размер кристаллов пчелиного воска. Такое отличительное изменение размера кристаллов может быть вызвано более сильным взаимодействием между кристаллами [91], как результат межмолекулярного взаимодействия между свободными жирными кислотами и спиртами [70]. Такие различия в кристаллической структуре могут вызвать особенности совместной кристаллизации фракций при образовании олеогеля.

#### 4.2.5 Термический анализ

На рисунке 15 показаны характерные пики плавления и кристаллизации нативного пчелиного воска и его фракций.

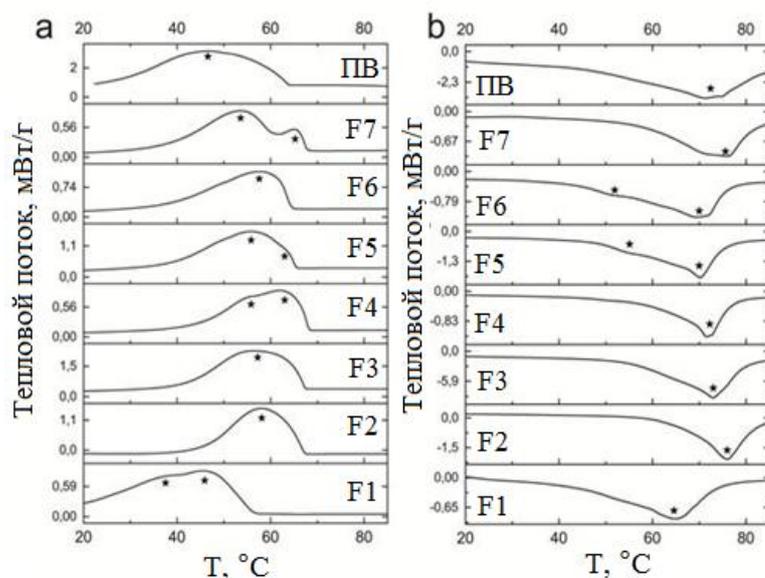


Рисунок 15. Дифференциально-сканирующая калориметрия (а – кристаллизация, б – плавление) пчелиного воска и его отдельных фракций

На рисунке 15а показана термограмма кристаллизация пчелиного воска и фракций F1 – F7. Профиль кристаллизации ПВ характеризуется одним пиком при 46,7 °С. Аналогично ПВ, один пик кристаллизации наблюдается для фракций F2, F3 и F6 при 58,1, 56,0 и 57,4 °С соответственно. Два пика кристаллизации наблюдается для фракций F1, F4, F5 и F7, что очевидно благодаря разнообразному составу фракций. Этот неоднородность может быть объяснена как наличием различных химических веществ или наличием различных полиморфных форм того же вида. Наибольшая разница между двумя пиками продемонстрирована для фракции F7 с пиками кристаллизации при 53,4 и 65,6 °С. Фракция F1 показала самую низкую степень кристаллизации при 45,9 и 38,7 °С. Фракции F4 и F5 имеют два аналогичных пика кристаллизации при 61,9 и 55,7 °С. Однако они различаются расположением наивысшего пика. Температура плавления пчелиного воска составляет 71,2 °С (Рисунок 15b), что выше диапазона 63–65 °С, указанного в исследованиях [69,92]. Это может связано с высоким содержанием свободных жирных кислот в пчелином воске [93], а также с более высокой скоростью нагрева при анализе. Практически все фракции имеют профиль плавления, характеризующийся одним пиком, кроме фракций F5 и F6 для которых характерны два пика плавления при 56,4 °С / 70,2 °С и 51,3 °С / 69,4

°С соответственно. Фракции F7 и F2 имеют аналогичную температуру плавления, равную 76,0 °С. Тем не менее, фракция F2 имеет более острый пик, чем F7. Фракция F1 имеет самую низкую температуру плавления 64,9 °С.

По данным профилей плавления бинарных смесей построены псевдо-фазовые диаграммы (рисунок 16).

Фазовые диаграммы бинарных смесей фракций отличаются от классических фазовых диаграмм отдельных молекулярных частиц, подробно описанных [94]. Существуют два основных отличия. Первый заключается в том, что не существует единой точки плавления во всем диапазоне концентраций, где ликвидус (выше которого вещество является жидким) и солидус (ниже которого вещество твердое) линии встречаются. Во-вторых, нет точной эвтектической точки, а есть эвтектический минимум на кривой ликвидуса. Такое фазовое поведение характерно для всех многокомпонентных смесей [95]. Как показано на рисунок 16, все бинарные комбинации, содержащие фракции F1 имеют эвтектический характер кристаллизации, что может быть связано с существенной разницей в температуре плавления и форме кристаллов [94]. Полученные данные о фазовом поведении УВ совпадают с имеющимися литературными данными, свидетельствующими об эвтектическом поведении смеси УВ/СЖК [96]. Положение минимума эвтектики для состава F1/F3 приходится на массовое соотношение F3 = 40 %, для составов F1/F2, F1/F4, F1/F5 и F1/F6 — на 80 % фракции F1. Эти комбинации также имеют области только с частичной смешиваемостью в твердом состоянии. В некоторых случаях линия солидуса отклоняется от идеального эвтектического поведения. Это может быть связано с несколькими факторами, среди которых полиморфизм и наличие примесей в образцах [94]. И наоборот, бинарные комбинации фракций от F2 до F6 с близкими температурами плавления и формами кристаллов образуют непрерывные твердые расплавы. Эти смеси полностью смешиваются в твердом состоянии. Полученные данные согласуются с опубликованными ранее [97] на примере комбинации различных видов восков, в частности воска рисовых отрубей и воска подсолнечника.

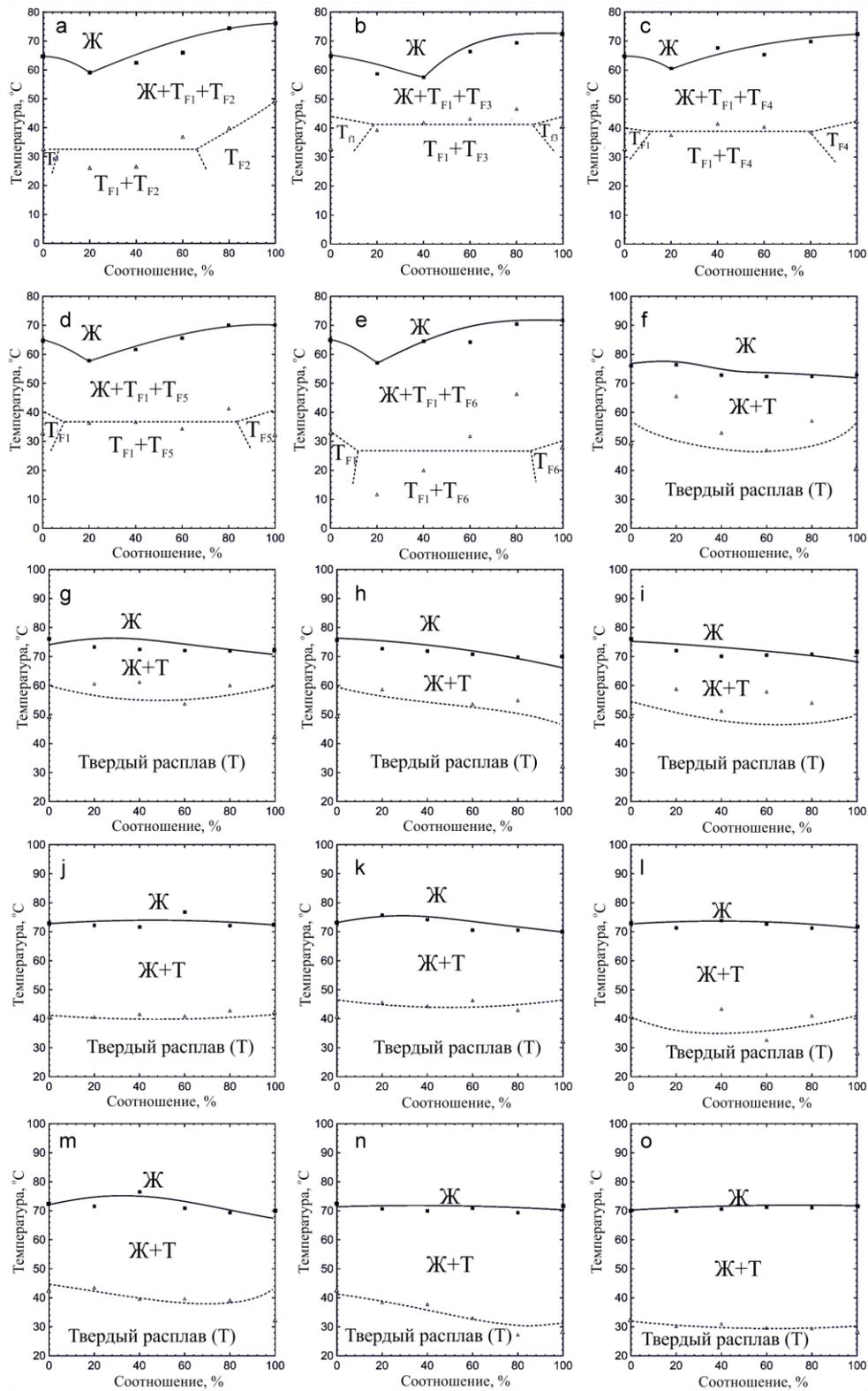


Рисунок 16. Псевдо-фазовые диаграммы бинарных смесей (а) F1/F2, (b) F1/F3, (c) F1/F4, (d) F1/F5, (e) F1/F6, (f) F2/F3, (g) F2/F4, (h) F2/F5, (i) F2/F6, (j) F3/F4, (k) F3/F5, (l) F3/F6, (m) F4/F5, (n) F4/F6, (o) F5/F6 (Заглавными буквами обозначены фазы Ж – жидкая, Т — твердая)

### 4.3 Изучение отдельных фракций пчелиного воска в качестве гелеобразователей олеогелей

При определении гелеобразующих свойств отдельных фракций для структурирования жидких масел одними из наиболее изучаемых параметров являются микроструктура и текстурные свойства.

#### 4.3.1 Изучение морфологии кристаллов олеогелей

На рисунке 17 показаны кристаллы олеогелей, структурированных пчелиным воском (ПВ) и его фракциями (F1-F6), полученные по технологии, описанной в пункте 3.1.

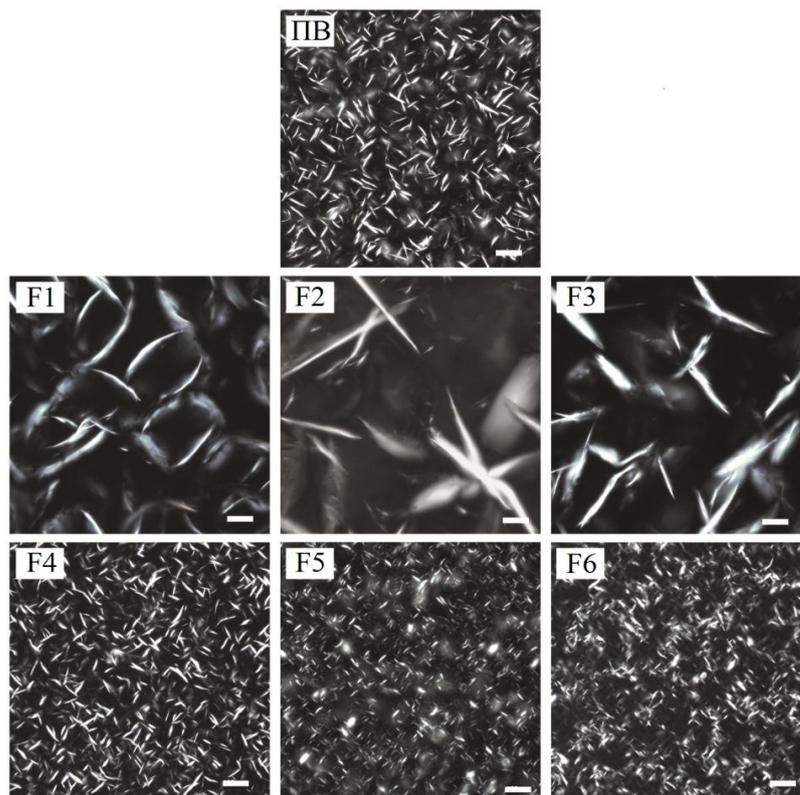


Рисунок 17. Световая поляризационная микроскопия олеогелей на пчелином воске, его фракциях и их комбинациях при 25°C. Горизонтальная шкала соответствует 100мкм

Кристаллы олеогелей существенно различаются как по размеру, так и по форме [80,82]. Более мелкие кристаллы (аналогично кристаллам фракций) наблюдаются в виде игольчатых структур. Тем не менее, микрофотографии более крупных кристаллов (F1, F2, F3) показывают, что эти структуры представляют собой пластинки, как было предложено [66]. Средняя длина края пластинки (размер кристалла) олеогеля ПВ составляет  $64,8 \pm 13,4$  мкм. Фракции F1 – F3 образовывали значительно более крупные кристаллы с размерами  $321,8 \pm 37,8$  мкм,  $390,0 \pm 130,1$  мкм и  $324,8 \pm 53,1$  мкм соответственно. Примечательно, что фракция F1, образовавшая искривленную структуру (рисунок 17) также образовывала слабоизогнутые пластинки с узлами на их пересечениях, аналогичные структуры, наблюдаются в олеогелях парафинового воска [98]. Фракции F2 и F3 образовали разветвленные структуры. Напротив, фракции F4 – F6 образовывали меньшие по размеру структуры, характеризующиеся высокой степенью связанности кристаллов с шероховатой поверхностью. Средние размеры кристаллов этих олеогели, равны  $52,8 \pm 14,0$  мкм,  $36,9 \pm 6,0$  мкм и  $43,4 \pm 9,8$  мкм соответственно. Размер и форма фракции F4 аналогичны кристаллам ПВ олеогелей. Образцы F5 и F6 сформировали агломераты неправильной формы. В работе [99] сказано, что этот эффект мог быть вызван увеличением скорости кристаллообразования. Это в свою очередь могло повлиять на размер кристаллов, изменение энтропии системы и, как следствие, на свойства образуемых олеогелей [80,82].

#### **4.3.2 Определение текстурных свойств олеогелей**

Текстуру сформированных олеогелей определяли путем оценки энергии, модуля Юнга (E) и значения предела текучести путем проникновения насадки конической формы. Результаты исследования текстурных свойств олеогелей представлены в таблице 9.

Таблица 9. Текстульные свойства олеогелей

Гелеобразователь	Энергия ( $\text{Нм}^{-1} \times 10^{-3}$ )	E ( $\text{Нм}^{-2} \times 10^3$ )
<b>ПВ</b>	$11,46 \pm 0,62$	$17,32 \pm 3,54$
<b>F1</b>	$16,22 \pm 1,11^*$	$19,64 \pm 2,27$
<b>F2</b>	$24,71 \pm 0,98^*$	$22,49 \pm 1,35$
<b>F3</b>	$11,82 \pm 0,23$	$15,20 \pm 0,13$
<b>F4</b>	$20,34 \pm 0,82^*$	$19,94 \pm 0,86$
<b>F5</b>	$3,36 \pm 0,21^*$	$14,11 \pm 0,85$
<b>F6</b>	$1,80 \pm 0,10^*$	$7,81 \pm 1,01^*$

Символом (\*) обозначены образцы, отличающиеся от контрольного олеогеля ПВ ( $p < 0,05$ )

Как показано в таблице 9, олеогели на пчелином воске (ПВ) в концентрации 6% имели показатели энергии равные  $11,46 \pm 0,62 \text{ Нм}^{-1} \times 10^{-3}$ , а показатель модуля упругости  $17,32 \pm 3,54 \text{ Нм}^{-2} \times 10^3$ . Показатели олеогеля, образованного индивидуальной фракцией F3 показывали результат, схожий с пчелиным воском, как по показателю твердости, так и по показателю модуля упругости. Образец на фракции F1 характеризовался достоверно большим ( $p < 0,01$ ) значением энергии по отношению к образцу на ПВ и составлял  $16,22 \pm 1,11 \text{ Нм}^{-1} \times 10^{-3}$ , но при проникновении индентера наблюдалось появление масляных капель на поверхности, что говорит о недостаточной способности связывать масло и тем самым свидетельствует о нецелесообразности использования этой фракции индивидуально. Олеогели на основе фракций F2 и F4, характеризующиеся высоким содержанием восковых эфиров имели заметно больший показатель энергии по сравнению с олеогелем на пчелином воске ( $24,71 \pm 0,98 \text{ Нм}^{-1} \times 10^{-3}$  и  $20,34 \pm 0,82 \text{ Нм}^{-1} \times 10^{-3}$  соответственно). Оба олеогеля имели статистически более высокие значения энергии, но при этом не имели достоверных отличий в модуле упругости. Несмотря на то, что олеогель, структурированный фракцией F2 показал значительно более высокий модуль упругости (модуль Юнга), но при визуальной оценке при воздействии индентера конической формы был ломким.

Эти данные являются дополнительным доказательством гипотезы [2], где говорится, что увеличение концентрации восковых эфиров (фракция F2) вызывает образование твердых, но хрупких олеогелей. Олеогели на фракциях F5 и F6 имели самые низкие значения текстурных свойств. Для этих образцов значение энергии составляло  $3,36 \pm 0,21 \text{ Нм}^{-1} \times 10^{-3}$  для образца на фракции F5 и  $1,8 \pm 0,1 \text{ Нм}^{-1} \times 10^{-3}$  для образца на фракции F6, что достоверно ниже по сравнению с олеогелем на пчелином воске. Образец на фракции F6 характеризовался также самым низким показателем модуля упругости  $7,81 \pm 1,01 \text{ Нм}^{-2} \times 10^3$ . В результате определения текстурных свойств показано, что фракции F5 и F6, характеризующиеся высоким содержанием свободных жирных спиртов и кислот образовывали олеогели с самыми низкими текстурными свойствами. Несмотря на это предполагается, что их использование в сочетании с фракциями, содержащими углеводороды или восковые эфиры способны образовывать наиболее прочные олеогели.

Таким образом, показано, что фракции ПВ имеют различную морфологию кристаллов, отличающихся по форме и размеру. Среди фракций выявлены значительные отличия по температуре плавления, что может быть использовано для корректировки температурных характеристик олеогелей. Определено, что бинарные комбинации фракции F1 с другими фракциями привели к образованию эвтектических систем. Комбинирование остальных фракций приводило к образованию твердых расплавов. При изучении возможности использования отдельных фракций ПВ в качестве гелеобразователей олеогелей путем определения морфологии кристаллов и текстурных свойств олеогелей показаны перспективы их использования.

## **ГЛАВА 5. ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАКЦИЙ В РЕГУЛИРОВАНИИ СВОЙСТВ ОЛЕОГЕЛЕЙ**

Материалы, опубликованные в данном разделе представлены в исследованиях [100–103].

Несмотря на выявленную возможность фракционирования пчелиного воска на 7 отдельных фракций (глава 4), разработанная методика не позволяла получать достаточное количество фракций (по массе), необходимое для технологических целей, при этом на ее осуществление требовалось большое количество растворителей. В связи с этим существовала необходимость оптимизации процесса фракционирования для получения отдельных фракций в достаточном количестве и со сниженным объемом используемых растворителей. Так как основными компонентами, присутствующими в составе пчелиного воска являются углеводороды, свободные жирные кислоты и спирты, каждая из которых придает особенные свойства структурированным с помощью них олеогелям, то процесс фракционирования должен быть направлен на извлечение каждого из этих компонентов с наибольшей чистотой для дальнейшего изучения и улучшения свойств олеогелей, структурированных этими компонентами.

Известно, что одним из подходов для улучшения свойств олеогелей и снижения количества вносимого гелеобразователя может быть комбинирование нескольких гелеобразователей. Ранее было показано [97], что путем комбинирования нескольких компонентов можно получать более низкие температуры плавления их смесей, относительно исходных компонентов. Также в главе 4 показано, что углеводороды при взаимодействии с другими компонентами воска могут образовывать эвтектики - смеси с пониженной температурой плавления, что в свою очередь может позволить избежать воскового ощущения во рту [68]. Известны также работы, связанные с комбинированием нескольких масел [51,104], однако, эффекты таких взаимодействий менее значительны, чем

комбинирование нескольких гелеобразователей. В работе [105] исследована роль сложных эфиров пчелиного воска и их комбинаций в гелеобразовании и показано, что путем смешения нескольких восковых эфиров можно добиваться изменения тепловых эффектов и улучшенного структурирующего действия. Тем не менее, отсутствуют систематические исследования комбинирования всех основных классов соединений, входящих в состав восков. В связи с этим оптимизация методики фракционирования позволит получать необходимое количество веществ с высокой степенью чистоты для технологических целей и позволит оценить вклад каждого из компонентов на свойства олеогелей, используемых как по отдельности, так и в комбинациях с различным соотношением этих компонентов.

### **5.1. Модификация процесса фракционирования**

В целом, процесс разделения пчелиного воска частично соответствовал методике, описанной в главе 4, однако для снижения количества растворителя было решено исключить из системы картридж SNAP Biotage 340. Чтобы компенсировать исключение данного картриджа, в полуую колонку для сухой загрузки (DLV-070, Biotage) предварительно добавляли 15 г чистого силикагеля, отделенного фриттой. Затем в резервуар добавляли полученный сухой порошок, после чего подключали к хроматографу. В качестве подвижной фазы использовали: гексан (Г), гексан-ацетон (90:10 об./об.) (ГА), а также изопропиловый спирт (ИПС) для смыва с колонки наиболее полярных компонентов. Параллельно было определено, что лучшее элюирование компонентов достигается в том случае, когда пчелиный воск растворяется в большем количестве элюента (1 часть воска : 10 частей элюента) и при увеличении содержания сорбента (1 часть воска : 5 частей сорбента). Также была изменена скорость потока элюента, которая составляла 20 мл/мин. Для разделения использовали четырехступенчатый градиент: I) 100% Г – 10 CV (объемов колонки); II) 80% Г и 20% ГА – 8 CV; III) 100% ГА – 6 CV; IV) 25% ГА и 75%

ИПС – 3 CV. Процесс разделения контролировали при двух длинах волн: 205 и 280 нм, в качестве холостого образца использовали гексан. Выбор длин волн соответствовал описанию в главе 4. Полученные фракции выпаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре равной 60-65 °С до постоянной массы. Изображение типичной хроматограммы и участки отбираемых фракций представлены на рисунке 18.

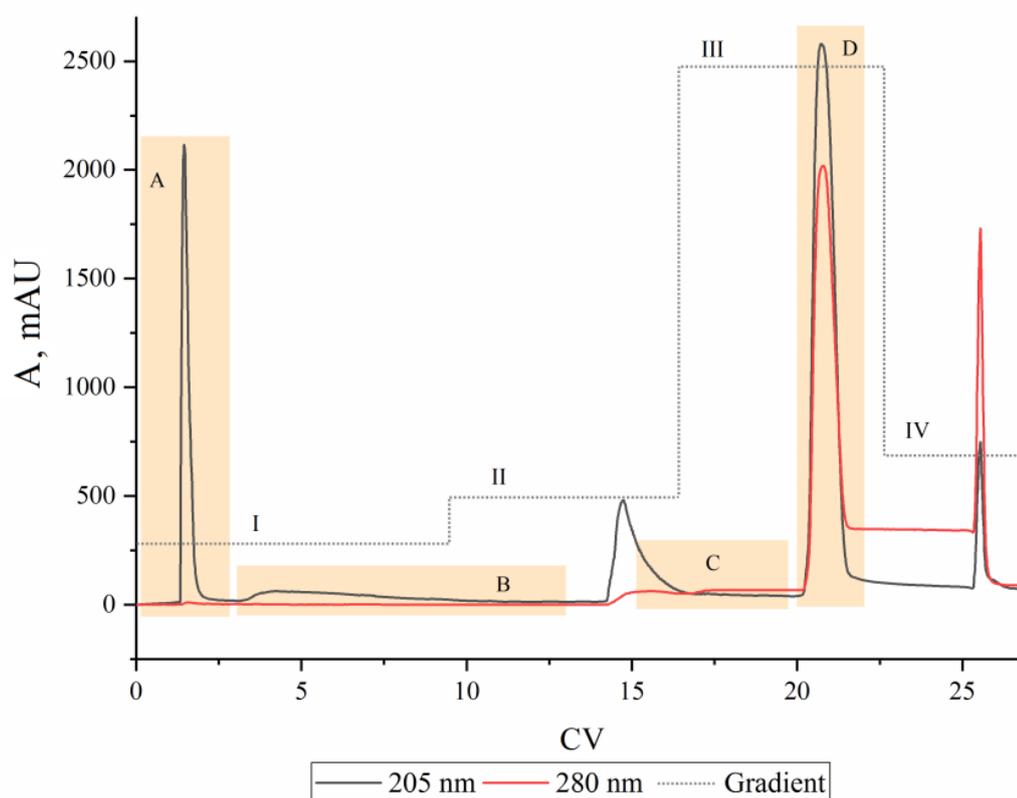


Рисунок 18. Типичная хроматограмма пчелиного воска, полученная с помощью препаративного флеш-хроматографа. Участок А – углеводороды; В – моноэфиры; С – восковые эфиры/жирные спирты/свободные жирные кислоты; D – жирные спирты/свободные жирные кислоты/восковые эфиры. Градиент: I) 100% Г – 10 CV; II) 80% Г и 20% ГА – 8 CV; III) 100% ГА – 6 CV; IV) 25% ГА и 75% ИПС – 3 CV

В результате проведенных изменений в методике фракционирования, количество используемых растворителей сократилось более чем в 3 раза. Было получено 4 отдельные фракции пчелиного воска, которые в дальнейшем были проанализированы с помощью аналитических методов. Время фракционирования

также существенно сократилось, что позволило совершать в несколько раз больше серий фракционирования и соответственно выделять большее количество фракций (по массе) достаточных для технологических целей.

## 5.2. Идентификация компонентного состава фракций

Определение химического состава исследуемых образцов имеет важное значение для объяснения их поведения при структурировании масел – [2]. Для получения качественной и количественной характеристики, фракции анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с детектором светорассеивания. Результаты количественного анализа представлены в таблице 10.

Таблица 10. Химический состав пчелиного воска и его фракций, измеренных с помощью ВЭЖХ с детектором светорассеивания

Компонент	Химическая композиция, %				
	ПВ	А	В	С	Д
УВ	13,1	99,3	3,7	0,0	0,0
ВЭ	62,0	0,7	95,1	66,4	10,1
СЖК	20,5	0,0	1,2	4,4	40,1
СЖС	4,4	0,0	0,0	29,2	49,8

УВ – углеводороды, ВЭ – восковые эфиры, СЖК – свободные жирные кислоты,  
СЖС – свободные жирные спирты

Согласно полученным данным, представленным в таблице 10, фракция А состоит в основном из углеводородов и следового количества восковых эфиров. Фракция В представляет собой в основном восковые эфиры и небольшого количества углеводородов и свободных жирных кислот, в сумме составляющих менее 5%. Фракция С содержит восковые эфиры и высокое содержание

свободных жирных спиртов, также менее 5% свободных жирных кислот. Наибольшее количество свободных жирных кислот и спиртов сконцентрировано во фракции D, восковых эфиров в ней около 10%. Согласно [2,25] углеводороды пчелиного воска представлены в основном соединениями C27, C29, C31 и C33. Сложные эфиры воска представляют собой смесь моно-, ди- и триэфиров. Моноэфиры — это сложные эфиры, состоящие из длинноцепочечных спиртов: C24, C26, C28, C30 и C32 и длинноцепочечных жирных кислот: C16, C18 и C24. Ди- и триэфиры также состоят из диолов: C24, C26, C28 и C30 и оксикислот: C16, C18 и C24.

Как показано [92] восковые эфиры пчелиного воска представлены моно-, ди- и триэфирами. Для более точной характеристики содержания восковых эфиров в отдельных фракциях был проведен их анализ методом тонкослойной хроматографии (рисунок 19).

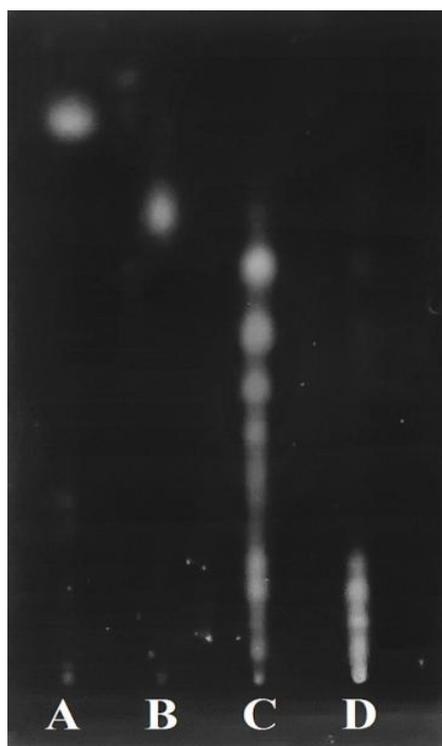


Рисунок 19. Результат тонкослойной хроматографии отдельных фракций (А, В, С, D) пчелиного воска

На основании результатов тонкослойной хроматографии (рисунок 19) установлено, что фракционный состав используемого пчелиного воска (ПВ)

соответствует составу восков, описанных в работе [92]. Показано, что восковые эфиры фракции В представлены только моноэфирами, фракция С – диэфирами и триэфирами. Фракция D содержит незначительное количество восковых ди- и триэфиров. Показано, что фракция А представлена преимущественно углеводородами. Результаты тонкослойной хроматографии согласуются с данными, полученными нами с помощью анализа ВЭЖХ (таблица 10).

### 5.3 Дизайн эксперимента

В качестве гелеобразователей были использованы фракции (А, В и С) которые отображали как образец 1 (10:0:0), образец 2 (0:10:0) и образец 3 (0:0:10) соответственно. Состав комбинаций 4-21 был расчетным и представлен в таблице 11. Комбинации фракций готовили из трех отдельных фракций пчелиного воска, так что их общее содержание равнялось 6 %. Фракции А, В и С добавляли в масло в различных пропорциях с шагом 20%. Содержание каждой фракции в образце маркировали как отношение (А:В:С). Например, образец, содержащий 20 % фракции А, 20 % фракции В и 60 % фракции С, был отмечен как (2:2:6). Стоит отметить, что обычно сложные эфиры воска представляют собой смесь моно-, ди- и триэфиров [25], но с помощью фракционирования мы смогли отделить моноэфиры от ди- и триэфиров во фракцию В. Всего был приготовлен и проанализирован 21 образец олеогеля, с различным соотношением гелеобразователей, представленных в таблице 11.

Таблица 11. Композиционный состав комбинаций гелеобразователей олеогелей

Образец олеогеля	Соотношение фракций (А:В:С)	Состав гелеобразователя			
		УВ, %	ВЭ, %	СЖС, %	СЖК, %
1	10:0:0	99,30	0,70	0,00	0,00
2	0:10:0	3,70	95,10	1,20	0,00
3	0:0:10	0,00	66,40	4,40	29,20

Таблица 11. Композиционный состав комбинаций гелеобразователей  
олеогелей

Образец олеогеля	Соотношение фракций (А:В:С)	Состав гелеобразователя			
		УВ, %	ВЭ, %	СЖС, %	СЖК, %
4	8:2:0	80,18	19,58	0,24	0,00
5	2:8:0	22,82	76,22	0,96	0,00
6	0:2:8	0,74	72,14	3,76	23,36
7	0:8:2	2,96	89,36	1,84	5,84
8	8:0:2	79,44	13,84	0,88	5,84
9	2:0:8	19,86	53,26	3,52	23,36
10	6:2:2	60,32	32,72	1,12	5,84
11	2:6:2	22,08	70,48	1,60	5,84
12	2:2:6	20,60	59,00	2,88	17,52
13	4:6:0	41,94	57,34	0,72	0,00
14	0:6:4	2,22	83,62	2,48	11,68
15	6:4:0	61,06	38,46	0,48	0,00
16	6:0:4	59,58	26,98	1,76	11,68
17	4:0:6	39,72	40,12	2,64	17,52
18	0:4:6	1,48	77,88	3,12	17,52
19	2:4:4	21,34	64,74	2,24	11,68
20	4:4:2	41,20	51,60	1,36	5,84
21	4:2:4	40,46	45,86	2,00	11,68

*А, В, С – фракции пчелиного воска*

Технология приготовления олеогелей соответствовала методике указанной в пункте 3.2. Концентрация гелеобразователя составляла 6 масс. % в подсолнечном масле. Для образования структуры образцы охлаждали до  $20 \pm 1$  °С со скоростью 1 °С/мин, а затем выдерживали в течение 24 ч перед испытанием. Температуру и скорость охлаждения контролировали в климатической камере КК240 (Pol-Еко-Аparatura, Польша).

## 5.4. Изучение свойств олеогелей

### 5.4.1 Анализ микроструктуры

Одними из важнейших параметров, характеризующих морфологию кристаллов, являются их форма и средняя длина кристалла ( $L_c$ ) – [106]. На рисунке 20 представлены микрофотографии кристаллов олеогеля, структурированных комбинациями фракций пчелиного воска в концентрации 6%.

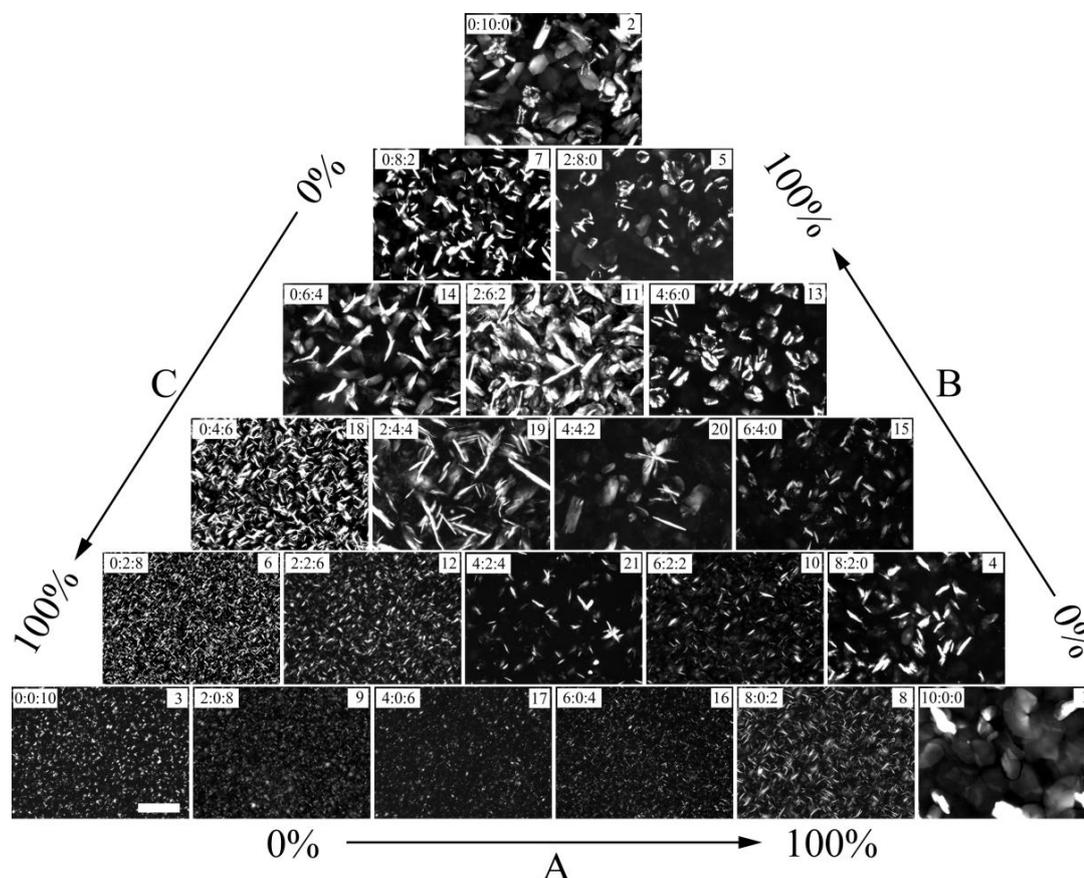


Рисунок 20. Световая поляризационная микроскопия олеогелей на основе фракций А, В, С и их комбинаций. Объектив Plan - Neofluar 20X. Горизонтальная шкала соответствует 100 мкм. Справа сверху указан номер образца. Слева сверху – массовые доли отдельных фракций в формате А:В:С

В вершинах треугольника представлены олеогели, приготовленные на отдельных фракциях А - образец 1 (10:0:0), В - образец 2 (0:10:0) и С - образец 3 (0:0:10). Среди исследованных образцов длина кристаллов значительно

варьировалась от минимального значения  $7,55 \pm 1,97$  мкм для кристаллов олеогеля образца 3 (0:0:10) до максимального значения  $69,54 \pm 18,44$  мкм для кристаллов образца 1 (10:0:0). Кристаллы олеогелей образца 2 (0:10:0) имели длину равную  $46,43 \pm 11,53$  мкм. Кристаллы в виде крупных многоугольных пластин формировались в олеогелях, структурированных фракцией А (образец 1 (10:0:0)), что характерно для кристаллов углеводородов [107]. Аналогичные пластинчатые кристаллы формировались в олеогелях фракции В (образец 2 (0:10:0)), что согласуется с более ранними исследованиями кристаллов олеогелей, структурированных чистыми ВЭ [108]. Существенные различия в кристаллах олеогеля обнаружены в образце 3 (0:0:10) фракции С, характеризующейся небольшим размером кристаллов (рисунок 21), но подобны по форме кристаллам олеогеля в пчелином воске, описанных в главе 3.

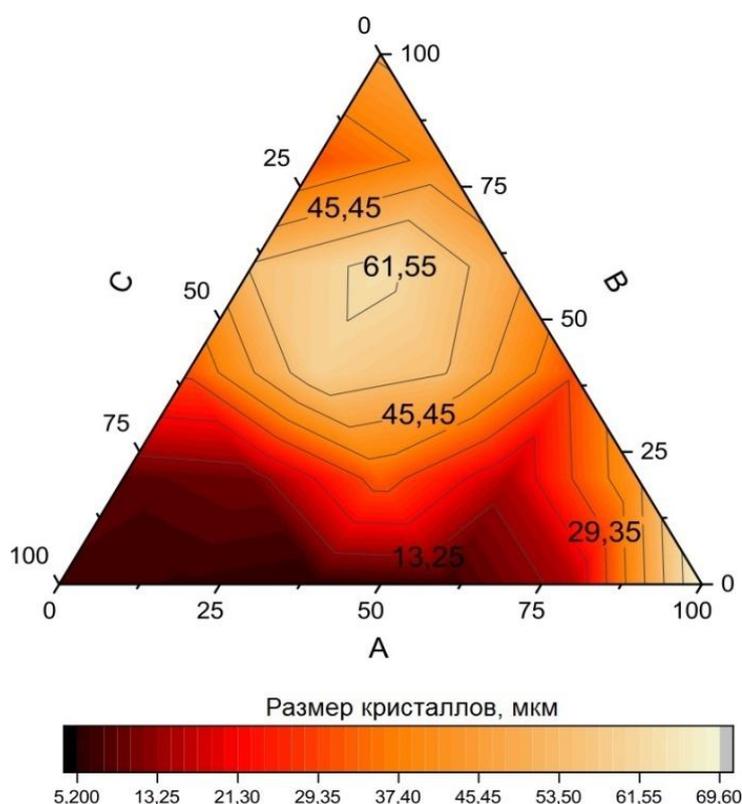


Рисунок 21. Показатель среднего размера кристаллов олеогелей (А – УВ; В – МЭ; С – ВЭ, СЖС, СЖК)

Для олеогелей на бинарных и тройных сочетаниях этих фракций кристаллы также существенно различались по размерам в зависимости от используемых соотношений. В целом размер кристаллов бинарных и тройных смесей также

значительно варьировался от  $5,23 \pm 1,84$  мкм до  $63,93 \pm 22,62$  мкм. Кристаллы олеогеля на смесях фракций А и С наименьшие значения средней длины (рисунок 21) и, наоборот, при объединении фракций А и В образовывались крупные кристаллы, в среднем более 30 мкм. При объединении фракций В и С образовывались как крупные кристаллы (при высокой концентрации фракции В), так и мелкие кристаллы (при высокой концентрации фракции С). При объединении всех трех фракций в олеогели образовывались как крупные кристаллы (образец 11 (2:6:2)) так и мелкие кристаллы (образец 12 (2:2:6)). Кристаллы образца 20 (4:4:2) представлены агрегированными пластинами. Это характерно и для образца 21 (4:2:4), но его кристаллы были значительно меньше, вероятно, из-за большего количества СЖК и СЖС (табл. 1). Исследование морфологии кристаллов олеогелей на исходном воске, содержащем большое количество углеводов, и олеогелей, структурированных чистыми углеводородами (дотриаконтаном), описано ранее [109]. Авторы показали, что кристаллы олеогелей, структурированных углеводородами, значительно крупнее кристаллов олеогелей на восковой основе. Авторы пришли к выводу, что такая тенденция может наблюдаться из-за многокомпонентного состава воска, приводящего к развитию смешанных систем с менее развитой трехмерной структурой и более мелкими кристаллами по сравнению с чистым веществом. В зависимости от используемой комбинации и химического состава фракций наблюдались как крупные, так и мелкие кристаллы, преимущественно пластинчатой формы. Некоторые образцы с высокой концентрацией фракций А и С (например, 3 (0:0:10), 6 (0:2:8), 9 (2:0:8), 12 (2:2:6), 16 (6:0:4) и 17 (4:0:6)) характеризовались как игольчатые. Однако, согласно исследованию [110], этот визуальный эффект был вызван ориентацией кристаллов перпендикулярно поверхности предметных стекол, но сообщается, что их реальная форма пластинчатая [66,111].

### 5.4.2. Определение маслосвязывающей способности

Способность структуры удерживать масло после центрифугирования свидетельствует о стабильности олеогеля и эффективности структурирования масла [110]. Структурирующая способность является одним из решающих факторов практического применения олеогелей и зависит от их микроструктуры [70]. Получены данные маслосвязывающей способности (МСС) олеогелей, структурированных отдельными фракциями пчелиного воска и их двойными и тройными комбинациями (рисунок 22).

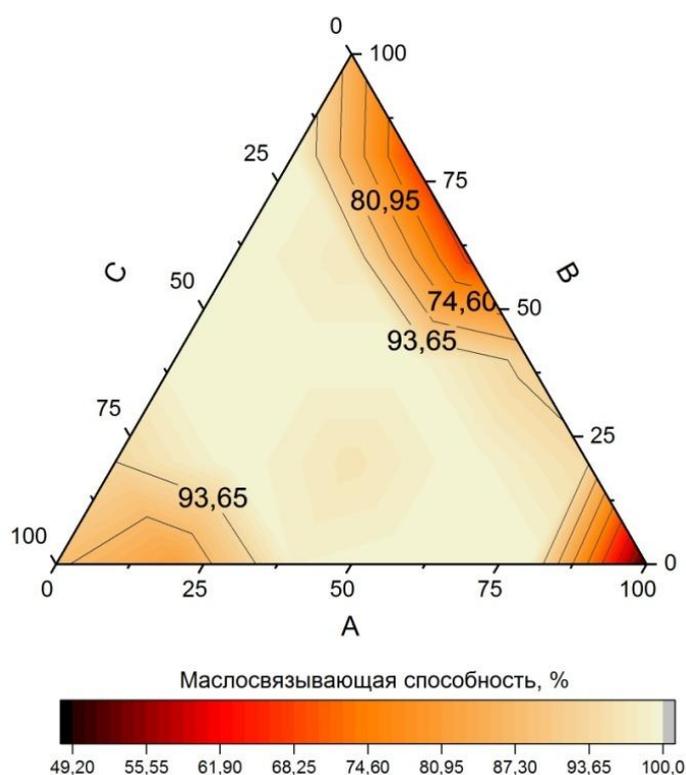


Рисунок 22. Маслосвязывающая способность олеогелей, структурированных фракциями пчелиного воска (А – УВ; В – МЭ; С – ВЭ, СЖС, СЖК)

В результате анализа (рисунок 22) показано, что при использовании отдельных фракций пчелиного воска (образцы 1 (10:0:0), 2 (0:10:0) и 3 (0:0:10) и их комбинации в различном соотношении (образцы 4–21) МСС олеогелей на их основе варьируется от 49,2 до 100%. Наименьшее значение МСС характерно для

олеогелей, структурированных углеводородами (образец 1 (10:0:0)). Так, для например, при комбинировании фракций А (углеводороды) и В (моноэфиры), образцы (4 (8:0:2), 15 (6:0:4), 13 (4:0:6), 5 (2:8:0)) характеризовались МСС в диапазоне от 68,6% до 94,5%, при этом увеличение содержания углеводов в сочетании с моноэфирами приводит к увеличению МСС. Аналогичная тенденция к увеличению МСС с увеличением содержания углеводов наблюдалась в образцах 8 (8:0:2), 9 (2:0:8), 16 (6:0:4) и 17 (4:0: 6) при объединении фракции А с фракцией С (восковые эфиры, жирные спирты, свободные жирные кислоты). В то же время бинарные комбинации фракций В и С (образцы 7 (0:8:2), 14 (0:6:4), 18 (0:4:6)) имели 100% МСС. Исключение составляет образец 6 (0:2:8) (93,6%), в котором наблюдается незначительное отделение масляной фазы. На основании полученных данных показано, что использование бинарных комбинации фракций пчелиного воска в олеогелях в целом приводит к увеличению МСС по сравнению с чистыми фракциями. Исследования влияния тройных комбинаций фракций А, В и С (образцы 10 (6:2:2), 11 (2:6:2), 12 (2:2:6), 19 (2:4:4), 20 (4:4:2), 21 (4:2:4)) показали, что их использование позволяет получать олеогели с высокой МСС от 96,3% до 100%.

### **5.4.3. Построение качественной фазовой диаграммы**

Способность структурировать жидкие масла обусловлена компонентным составом пчелиного воска. Фракционирование пчелиного воска позволяет оценить вклад каждого из них в процесс гелеобразования. Поскольку мы проводили исследования при одной и той же концентрации гелеобразователей, можно оценить влияние отдельных фракций и их комбинаций на гелеобразование при разных температурах (рисунок 23).

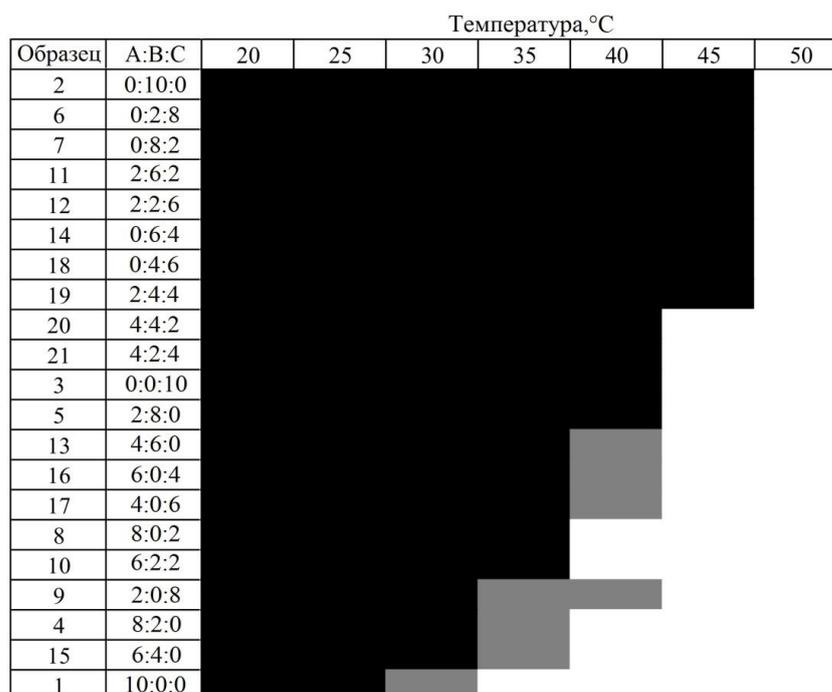


Рисунок 23. Фазовая диаграмма исследуемых композиций олеогелей при различных температурах: гель (черная зона), вязкая жидкость (серая зона) и жидкость (белая зона)

На рисунке 23 видно, что образец 1 (10:0:0) является наиболее легкоплавким олеогелем, а образцы 2 (0:10:0), 6 (0:2:8), 7 (0:8:2), 11 (2:6:2), 12 (2:2:6), 14 (0:6:4), 18 (0:4:6) и 19 (2:4:4) были наиболее тугоплавкими из-за их компонентного состава. Углеводороды были основным компонентом образца 1 (10:0:0) (табл. 11). Олеогели на основе пчелиного воска и отдельные его фракции относятся к физическим (термически обратимым) гелям, в связи с чем температура плавления олеогелей при структурировании будет ниже температуры плавления чистого гелеобразователя. При этом тенденция «самый тугоплавкий гелеобразователь образует наиболее тугоплавкий олеогель и наоборот» может сохраняться. По результатам исследования бинарных сочетаний фракций пчелиного воска (образцы 4–9, 13–18) на гелеобразующую способность при различных температурах установлено, что олеогели, содержащие фракцию А в различном соотношении с фракциями В (образцы 4 (8:2:0), 13 (4:6:0), 15 (6:4:0) и С (образцы 8 (8:0:2), 9 (2:0:8), 16 (6:0:4), 17 (4:0:6)) сохраняют гелеобразующую способность при повышении температуры до 35 °С. Исключение составляет

образец 5 (2:8:0), который сохраняет гелеобразное состояние при 40 °С. В то же время бинарные комбинации на основе фракций В и С (образцы 6 (0:2:8), 7 (0:8:2), 14 (0:6:4), 18 (0:4:6)) позволяют получать более тугоплавкие олеогели, сохраняющие гелеобразное состояние при 45 °С. Также в исследованных композициях не выявлено переходного состояния, характеризующегося вязкой жидкостью. Так, содержание наиболее легкоплавкой фракции А (смесь углеводов) в составе приводит к получению легкоплавких олеогелей. В то же время в случае сочетания углеводов и сложных моноэфиров (образцы 4 (8:2:0), 5 (2:8:0), 13 (4:6:0), 15 (6:4: 0)), увеличение содержания моноэфиров до 60 и 80% (образцы 13 (4:6:0) и 5 (2:8:0) соответственно) увеличивает температуру гелеобразного состояния. Изучение влияния тройных комбинаций, включающих фракции А, В и С, на гелеобразующую способность при различных температурах показало, что снижение концентрации наиболее легкоплавкой углеводородной фракции приводит к повышению температуры фазового перехода. Наиболее тугоплавкими (45 °С) оказались образцы олеогелей (11 (2:6:2), 12 (2:2:6) и 19 (2:4:4)) с высоким содержанием моноэфиров или восковых эфиров.

#### 5.4.4. Термический анализ

Температуры фазового перехода олеогелей, структурированных с помощью отдельных фракций пчелиного воска или их комбинации изучали с помощью дифференциально-сканирующего калориметра (ДСК). Показано, что олеогели на основе отдельных фракций А и В характеризовались одним пиком кристаллизации при 34,53 °С и 51,38 °С соответственно. Изотерма кристаллизации олеогеля на основе фракции С характеризуется двумя пиками при 33,01 °С и 45,18 °С. Однако в бинарных комбинациях 4 (8:2:0), 8 (8:0:2) и 16 (6:0:4) наблюдалась одновременная кристаллизация обоих компонентов (рисунок 24)

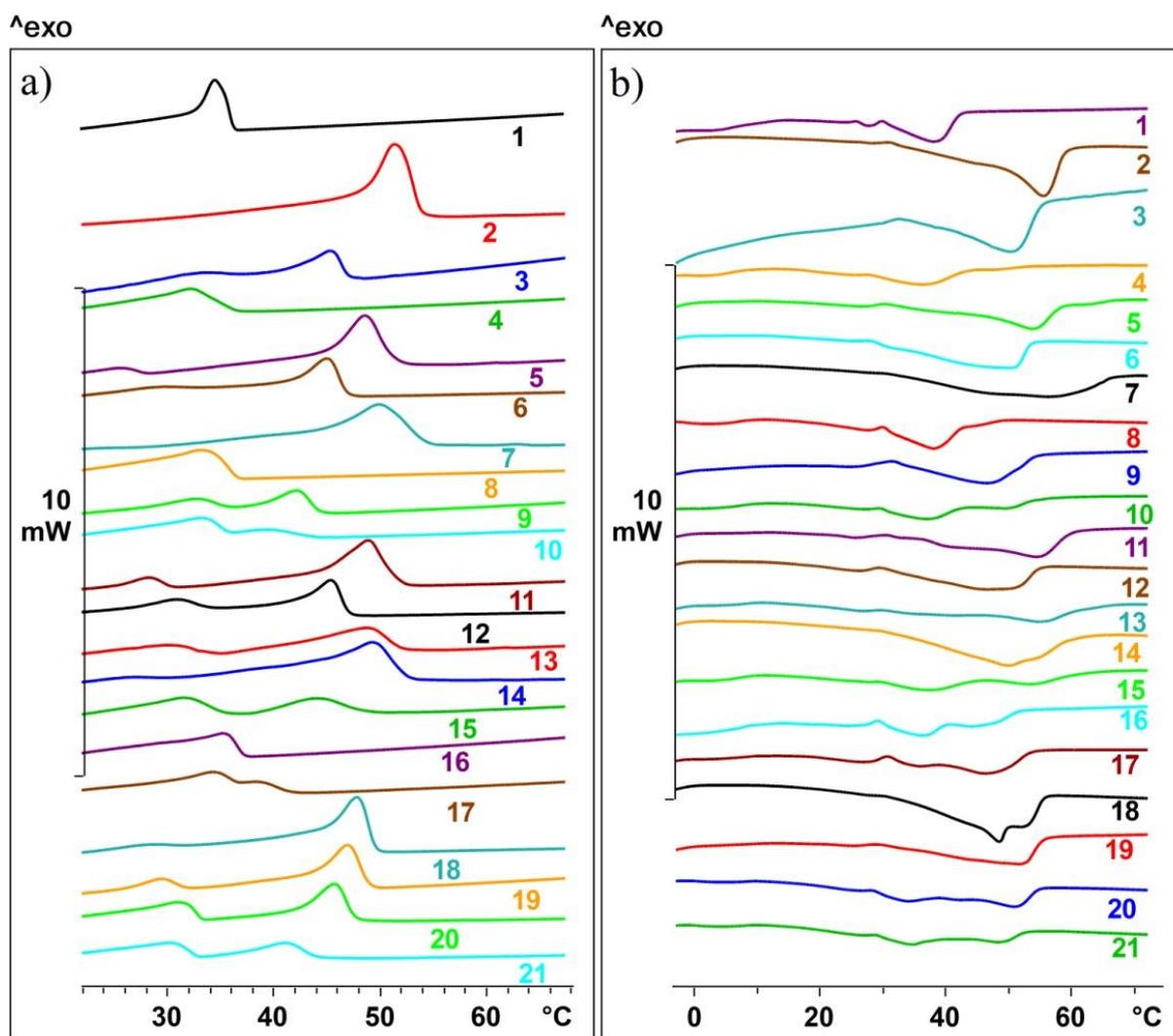


Рисунок 24. Кривые кристаллизации (а) и плавления (б) олеогелей. Цифры от 1 до 21 соответствуют номерам образцов

Об одновременной кристаллизации свидетельствует наличие только одного пика кристаллизации (рисунок 24а). При этом известно, что один пик кристаллизации в бинарных системах может быть признаком образования эвтектических смесей, как это было показано в главе 4, раздел 4.2.5.

Важным показателем при определении термических характеристик олеогелей является температура начала кристаллизации. Информация о температуре начала кристаллизации ( $T_{\text{onset}}$ ) всех исследованных образцов представлена на рисунок 25.

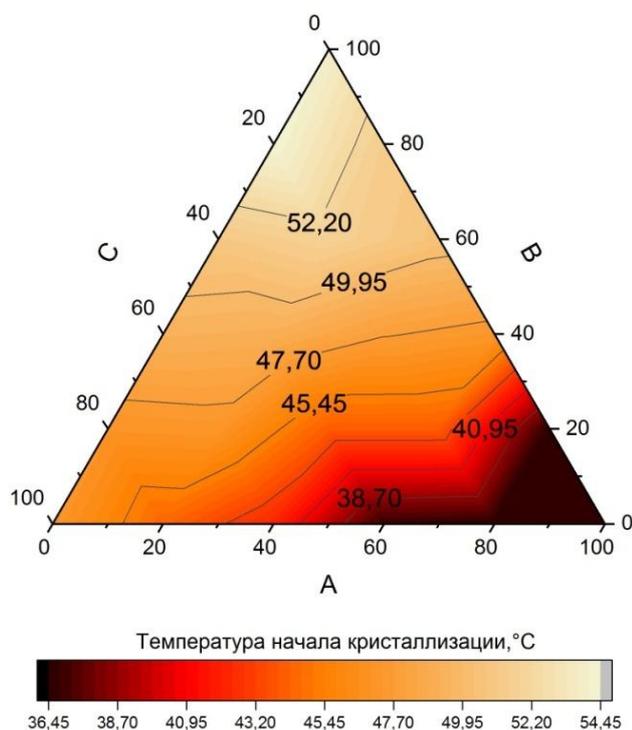


Рисунок 25. Температура начала кристаллизации олеогелей, структурированных фракциями пчелиного воска (А – УВ; В – МЭ; С – ВЭ, СЖС, СЖК)

На рисунке 25 представлена карта распределения температур начала кристаллизации, представляющая собой поверхность ликвидуса для трехкомпонентной системы. Самые низкие температуры начала кристаллизации характерны для комбинаций с высоким содержанием фракции А. Температуры начала кристаллизации плавно снижаются для всех комбинаций с увеличением концентрации фракции А, кроме бинарных комбинаций, содержащих 60 % фракции С и 80 % фракции В. Таким же образом изучались термограммы плавления образцов, представленных на рисунке 24б. Наименьшую температуру плавления имеет олегель на основе фракции А (38,17 °С, образец 1 (10:0:0)), а самую высокую — на основе фракции В (55,47 °С, образец 2 (0:10:0)). Температура плавления олеогеля на основе фракции С составляет 50,31 °С (образец 3 (0:0:10)). Термограммы плавления характеризовались наличием большего количества пиков плавления по сравнению с термограммами

кристаллизации. Это может быть связано с наличием полиморфных превращений в исследованных образцах при плавлении [112].

### 5.4.5 Определение текстурных свойств

Механическая прочность олеогелей является важным фактором при их практическом применении в пищевых продуктах [70]. Механическую прочность определяли как твердость олеогелей. Образцы характеризовали при 20 °С в состоянии «геля», согласно рисунку 23. Прочность исследованных олеогелей колебалась от  $0,18 \pm 0,01$  Н до  $3,98 \pm 0,49$  Н. Полученные результаты представлены на рисунке 26, где темные и светлые области соответствуют более низкой и более высокой стойкости олеогелей соответственно.

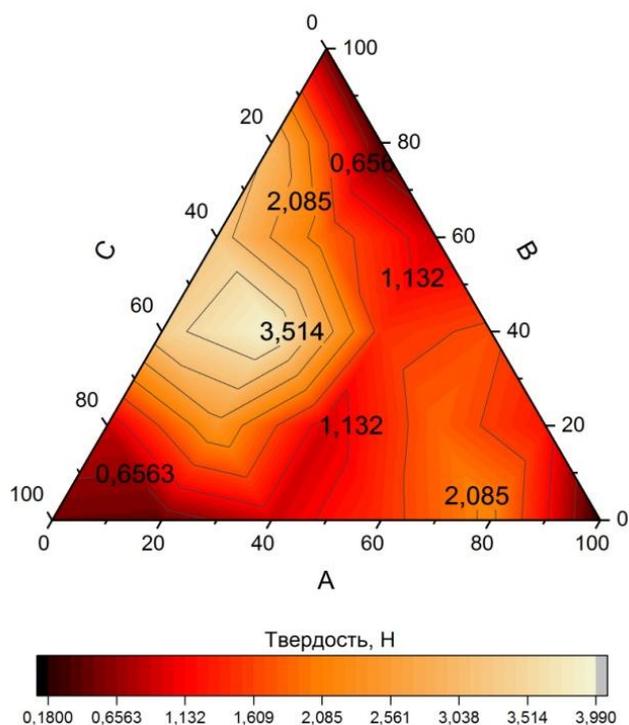


Рисунок 26. Твердость олеогелей, структурированных фракциями пчелиного воска (А – УВ; В – МЭ; С – ВЭ/СЖС/СЖК)

Согласно рисунку 26 образцы олеогеля, структурированные фракциями А, В или С, обладают наименьшей твердостью. Уменьшение этого показателя наблюдалось в диапазоне: образец 2 (0:10:0) > образец 3 (0:0:10) > образец 1 (10:0:0). Большинство исследованных олеогелей на комбинациях фракций имели более высокую твердость, чем олеогели на отдельных фракциях. Исключение составили образцы 5 (2:8:0) и 9 (2:0:8). Достоверное увеличение твердости олеогелей на бинарных комбинациях фракций А и С обнаружено в образцах 8 (8:0:2), 16 (6:0:4) и 17 (4:0:6). Также, увеличение твердости характерно при объединении фракций А и В в образцах 4 (8:2:0), 13 (4:6:0) и 15 (6:4:0), у которых твердость увеличивается более чем в 2 раза, относительно образцов 1 (10:0:0) и 2 (0:10:0). Анализ бинарных сочетаний фракций В и С показал, что образцы 7 (0:8:2), 14 (0:6:4), 18 (0:4:6) и 6 (0:2:8) имели более высокую стойкость по сравнению с образцами 2 (0:10:0) и 3 (0:0:10). Было дополнительно оценено влияние комбинирования всех трех фракций на текстуру олеогелей, в результате чего показан положительный эффект. Все образцы тройных комбинаций (10 (6:2:2), 11 (2:6:2), 12 (2:2:6), 19 (2:4:4), 20 (4:4:2), 21 (4:2:4)) обладали повышенной твердостью по сравнению с олеогелями, структурированными отдельными фракциями А, В и С. В нашем исследовании олеогели с различной морфологией кристаллов имели наибольшую прочность (МСС и твердость). Например, образец 19 (2:4:4), имеющий крупные кристаллы, характеризовался наибольшей твердостью (рисунок 6). Напротив, некоторые олеогели с крупными кристаллами имели более низкую твердость и МСС (например, образец 1 (10:0:0)). Мы обнаружили, что большинство тройных комбинаций фракций имели лучшие гелеобразующие свойства по сравнению с исходными фракциями (А — углеводороды; В — моноэфиры; С — восковые эфиры, жирные спирты и свободные жирные кислоты).

## 5.5. Корреляционный анализ

С использованием полученных данных был проведен анализ корреляционных связей между изучаемыми показателями (таблица 12).

Таблица 12 – Результаты корреляционного анализа

	МСС	Твердость	Lc	T <sub>onset</sub>	УВ	ВЭ	СЖК+СЖС
МСС, %	—	0,631*	-0,352	0,070	-0,278	0,191	0,337
Твердость, Н		—	0,152	0,254	-0,249	0,263	0,066
Lc,			—	0,270	0,129	0,096	-0,626*
T <sub>onset</sub>				—	-0,804**	0,925**	0,025
УВ					—	-0,945**	-0,555*
ВЭ						—	0,251
СЖК+СЖС							—

\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$

Как показано в таблице 12, значения твердости и МСС имели статистически значимую корреляцию только между собой ( $r = 0,631$ ,  $p < 0,01$ ). Так, у более твердых образцов МСС была преимущественно выше, что согласуется с работой [71]. Однако были образцы, которые не следовали этой схеме. Согласно [113], на МСС восковых олеогелей влияет множество факторов, в том числе кристаллическая структура, размеры и форма кристаллов, а также их пространственное распределение. Обычно считается, что взаимодействия, связанные с образованием геля, оказывают значительное влияние на способность связывать масло. Согласно [14] к таким взаимодействиям относятся водородные связи,  $\pi$ - $\pi$ -стэкинговые, электростатические и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. В исследовании [114] авторы также утверждают, что структура кристаллической сетки, отвечающая за механические свойства геля, сильно зависит от типа молекулярных взаимодействий и ориентации молекул гелеобразователя. Твердость также зависит от различных факторов, таких как влияние дисперсионной среды (глава 3), а также дисперсной фазы (глава 4), что

согласуется с исследованиями [2,115]. Согласно [18] твердость может зависеть от полиморфных превращений кристаллов гелеобразователей при хранении. Твердость зависит от используемых технологических приемов, таких как спекание [18], скорость охлаждения [72,116], скорость сдвига [116] или применение ультразвука [117,118]. Согласно исследованию [118] показано, что изменение технологии приготовления олеогелей, например вследствие воздействия ультразвуком, способствует снижению размера кристаллов и, тем самым, может приводить как к улучшению, так и снижению некоторых технологических свойств (например, твердости и маслосвязывающей способности).

В проведенном исследовании наиболее тесные корреляции ( $p < 0,001$ ) между составом и температурой начала кристаллизации наблюдались для фракций УВ ( $r = -0,804$ ) и ВЭ ( $r = 0,925$ ). Это связано с тем, что при смешении фракций пчелиного воска образовались системы с неконгруэнтной температурой плавления, то есть  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации смеси никогда не превышает  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации ее наиболее тугоплавкого компонента. Это соответствует ранее полученным данным о кристаллизации различных бинарных комбинаций фракций пчелиного воска в главе 4. В исследованных системах наибольшую  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации имел образец 2 (0:10:0), содержащий в основном ВЭ, а наименьший – образец 1(10:0:0), содержащий только УВ. В связи с этим увеличение доли ВЭ приводит к увеличению  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации, а увеличение доли УВ – к ее уменьшению. Более низкие значения коэффициента корреляции между  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации и содержанием УВ обусловлены комбинациями 4 (8:2:0), 8 (8:0:2) и 16 (6:0:4), содержащими большое количество УВ, являющихся эвтектиками и их  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации снижается нелинейно. Длина кристалла в олеогеле имеет тесную отрицательную корреляцию с содержанием СЖК и СЖС ( $r = -0,626$ ,  $p < 0,01$ ), поэтому увеличение их содержания приводит к уменьшению длины кристалла. Это связано с тем, что СЖК с СЖС образуют смешанные кристаллы в результате совместной кристаллизации, что приводит к образованию мелких кристаллов [70]. Следовательно, большее количество СЖК и СЖС в

олеогеле приводит к более мелкому размеру кристаллов, что уменьшает средний размер кристаллов в олеогеле. В данной работе концентрации гелеобразователя во всех исследованных олеогелях были одинаковыми; следовательно, изменение количества одной из фракций приводило к пропорциональному изменению количества других фракций. Это является причиной наблюдаемых отрицательных корреляций между содержанием УВ и содержанием ВЭ ( $r = -0,945$ ,  $p < 0,001$ ), а также с содержанием СЖК + СЖС ( $r = -0,555$ ,  $p < 0,01$ ). Корреляции между твердостью и средней длиной кристаллов обнаружено не было ( $r = 0,152$ ,  $p > 0,05$ ). Это свидетельствует о том, что размер кристаллов не является ключевым фактором, влияющим на твердость олеогелей на основе различных гелеобразователей. Значения МСС, твердости и  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации олеогеля, структурированного комбинациями восковых фракций сравнивали со значениями, измеренными для олеогеля на основе пчелиного воска (МСС = 100%, твердость = 1,7 Н,  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации = 48,14 °С). Были выделены две группы параметров (выше или ниже, чем у олеогелей пчелиного воска) и исследованы с помощью анализа множественных соответствий (рисунок 27).

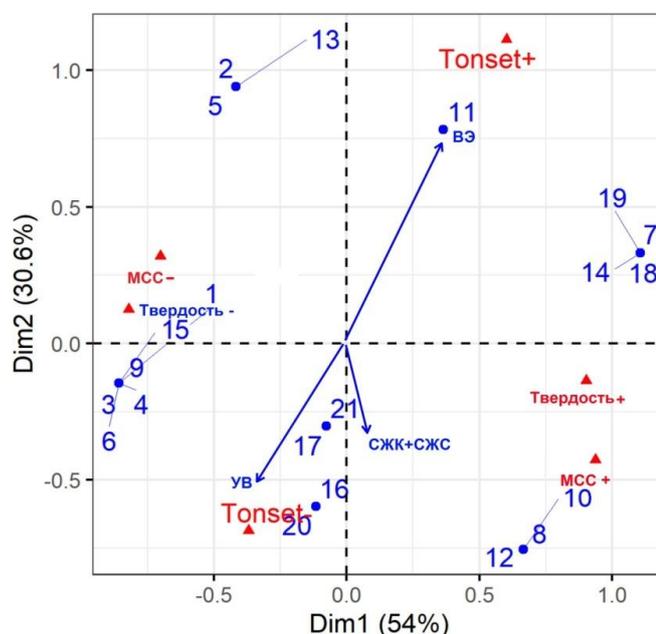


Рисунок 27. График анализа множественных соответствий ("+" и "-" обозначают области, где значения  $T_{\text{onset}}$ , твердости и МСС выше или ниже, чем у олеогелей на пчелином воске соответственно)

На рисунке 27 показано, что первые два измерения описывают 84,6% вариаций между исследуемыми выборками. Первое измерение (Dim1) в основном описывает изменение твердости и МСС. Справа представлены образцы олеогеля с более высокими значениями, чем у олеогеля на пчелином воске. Слева те, у которых меньше значение. Второе измерение (Dim2) в основном описывает разницу  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации. Сверху представлены образцы олеогелей с более высокой  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации, чем у олеогелей пчелиного воска, а снизу наоборот, ниже. Температура начала кристаллизации положительно коррелирует с концентрацией ВЭ и отрицательно с УВ. Концентрация СЖК + СЖС положительно коррелирует с твердостью и МСС. Можно выделить четыре основные группы образцов в зависимости от интенсивности их параметров. В первую группу входят олеогели с высокой  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации, твердостью и МСС (образцы 7 (0:8:2), 14 (0:6:4), 18 (0:4:6), 19 (2:4:4). Эти образцы содержат преимущественно сложные эфиры воска (64,74–89,36% ВЭ) и свободные жирные кислоты и спирты (7,86–20,64% СЖК + СЖС).

Вторую группу составляют образцы с низкой  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации, но высокими показателями твердости и МСС (образцы 8 (8:0:2), 10 (6:2:2), 12 (2:2:6)). В эту группу в основном входят образцы, содержащие большое количество углеводов. Среди них образец № 8 (8:0:2) представляет собой эвтектическую смесь преимущественно углеводов с ВЭ, СЖК и СЖС. Среди образцов, полученных на комбинации трех фракций этой группы, образец 12 (2:2:6) выделяется самым высоким МСС и твердостью.

В третью группу входят олеогели с низким началом кристаллизации, твердостью и МСС (образцы 1 (10:0:0), 3 (0:0:10), 4 (8:2:0), 6 (0:2:8), 9 (2:0:8) и 15 (6:4:0). В эту группу входят образцы с низким содержанием тугоплавкой фракции В (моноэфиры). В четвертую группу входят олеогели с высокой  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации, но низкой твердостью и МСС (образцы 2 (0:10:0), 5 (2:8:0), 13 (4:6:0)), которые содержат в основном восковые эфиры (57,34–95,10% ВЭ) и углеводороды (22,82–41,94% УВ).

Образец 11 (2:6:2) обладал повышенной твердостью,  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации и низким МСС, а также олеогели с низкой  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации и имеющие низкую МСС с высокой твердостью (образцы 17 (4:0:6), 21 (4:2:4)) и высокую МСС с низкой твердостью (образцы 16 (6:0:4) и 20 (4:4:2)) выделяются отдельно. Уменьшение  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации может быть предпочтительным с органолептической точки зрения как способ уменьшить восковое ощущение во рту, описанное в [68]. Наиболее предпочтительным в этом контекстом были образцы из второй группы с низким началом кристаллизации и высокими показателями твердости и МСС. Все образцы олеогелей, полученные с использованием отдельных фракций пчелиного воска, попали в группы с пониженной твердостью и МСС. В связи с этим их индивидуальное использование для структурирования подсолнечного масла нецелесообразно.

Таким образом, оценена возможность структурирования подсолнечного масла с помощью бинарных и тройных комбинаций фракций пчелиного воска (А, В и С) в разных соотношениях. В результате исследования влияния фракций пчелиного воска и их комбинации на гелеобразующие свойства олеогелей на подсолнечном масле было показано, что соотношение между изученными фракциями преимущественно влияет на свойства олеогеля нелинейным образом. Исключением является  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации, которая находится в тесной положительной линейной корреляции с содержанием восковых эфиров и в отрицательной корреляции с содержанием углеводов. Было показано, что восковые эфиры (64,74–89,36%) с добавлением свободных жирных кислот и спиртов (7,86–20,64%) образуют олеогели с высокой  $T_{\text{onset}}$  кристаллизацией, твердостью и маслосвязывающей способностью. Для снижения  $T_{\text{onset}}$  кристаллизации, необходимо увеличить содержание углеводов (до 80,18%) за счет снижения содержания восковых эфиров. Эти результаты могут быть использованы для направленной коррекции состава восковых гелеобразователей с целью регулирования свойств олеогеля. В этом случае коррекция может осуществляться как путем фракционирования, так и объединяя отдельные типы восков с различными химическими составами.

## ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЧЕЛИНОГО ВОСКА И КОМБИНАЦИЙ ЕГО ФРАКЦИЙ НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ПИЩЕВЫХ ОЛЕОГЕЛЕЙ

Материалы, опубликованные в данном разделе представлены в публикациях [47,102,103,119–122].

Снижение содержания в продуктах насыщенных жирных кислот за счет применения олеогелей приводит к использованию высоконенасыщенных жиров (масел), подверженных интенсивному окислению. При этом большинство современных технологий получения олеогелей включает стадию тепловой обработки для полного расплавления гелеобразователя [120]. Температура, необходимая для получения олеогелей, варьируется в зависимости от типа гелеобразователя: для различных восков и смеси  $\beta$ -ситостерола +  $\gamma$ -оризанола - (80-90) °С, в соответствии [123], [124]; для этилцеллюлозы (до 150 °С), согласно [125], при этом длительность температурного воздействия при получении, варьируется от нескольких минут до нескольких часов. В совокупности два эти фактора способствуют развитию окислительных процессов в маслах, в соответствии с [126]. Так, например, использование моноглицеридов в технологии олеогелей может быть сопряжено с риском накопления 3-монохлорпропан - 1,2-диола при производстве и хранении [121].

Исследования олеогелей, структурированных восками, показывают возможность получения липидным систем, по функциональности аналогичных твердым жирам, применяемым в пищевых продуктах. На физико-химические свойства и стабильность при хранении олеогелей, структурированных восками, влияют не только составы используемого масла и воска, но и параметры получения (скорость охлаждения, скорость сдвига, температура) [116]. Природные воски, в частности, пчелиный воск (ПВ), имеют сложный химический состав, при этом выделяют основные соединения (углеводороды, восковые эфиры, свободные жирные кислоты и спирты) и минорные соединения:

альдегиды, кетоны, вторичные спирты, сложные эфиры стеролов, полифенольные соединения, представленные в основном флавоноидами [2,116,127].

Для изучения степени окисления олеогелей, структурированных воском, за последние годы были применены различные методы и подходы. Классическим методом изучения влияния различных восков на окислительную стабильность олеогелей, является определение первичных продуктов окисления с помощью перекисного числа [69,128]. Данный метод позволяет определить наличие в составе гидропероксидов, однако не способен определить наличие других продуктов окисления, таких как альдегиды, кетоны, спирты и т.д. При этом низкий показатель перекисного числа не всегда отражает меньшую степень окисления, поскольку гидропероксиды образуются и превращаются во вторичные продукты окисления непрерывно во время окисления липидов [129]. Для корректного описания процесса окисления олеогелей, помимо изучения изменения перекисного числа, необходимо также в дополнение использовать методы по определению продуктов окисления, например анизидиновое число [129], содержание малонового диальдегида [130], содержание конъюгированных диенов и летучих органических соединений [131]. Также ряд исследователей используют подходы, позволяющие в более короткие сроки определить степень окисления образца исследуя значение его периода индукции, применяя такие приборы как Rancimat [123] или Oxitest [119]. В данных работах окислительную стабильность олеогелей определяли при температурах 120°C и 90°C соответственно, что выше температуры плавления олеогелей. Основной гипотезой в изучении окислительной стабильности олеогелей является то, что за счет структурирования масла процесс окисления замедляется. Имеющиеся литературные данные результатов исследования окислительной стабильности олеогелей по сравнению с неструктурированным маслом являются противоречивыми. Так, в работе [129] показано, что олеогели больше подвержены окислению, согласно показателю перекисного числа, чем исходное масло. И, напротив, в работе [131] показано антиоксидантное действие воска в составе олеогеля. Однако исследования окислительной стабильности олеогелей в данных

работах проводились при температурах 50 °С и выше, что приводит к частичному или полному плавлению гелеобразователя и как следствие к переходу олеогеля из твердого состояния в текучее. При этом авторы исследования [132] говорят о том, что более твердые гели окисляются медленнее, так как плотная структура уменьшает диффузию кислорода в объем олеогеля, и как следствие замедляет окисление масла. Данная гипотеза рассматривалась в работах [119] и [133] при этом исследования проводились при температуре от 4 °С до 35 °С. В настоящее время консенсус в понимании различий в процессах окисления олеогелей в сравнении с неструктурированным маслом отсутствует. Это может быть связано с недостаточностью использованных отдельными авторами методов.

Исследования окислительной стабильности олеогелей также актуальны с точки зрения влияния на органолептические показатели готовой продукции. При окислительных процессах, протекающих в жиросодержащих продуктах, происходит образование свободных радикалов, гидропероксидов и др., в результате чего формируется прогорклый вкус и запах, что согласно [134] негативно отражается на потребительской оценке. Как отмечалось ранее, олеогели содержат большое количество ненасыщенных жирных кислот подверженных окислению, что отрицательно сказывается на вкусе готовой продукции, содержащей олеогели, например мясных продуктов [135]. В настоящее время проведены исследования окислительной стабильности различных мясных продуктов, содержащих олеогели и показано, что при полной или частичной замене животного жира на олеогели, такая замена может не оказывать влияния на органолептические показатели и окислительную стабильность готовой продукции, в соответствии с [136], а также, напротив, в готовой продукции отмечались наиболее высокие значения степени окисления липидов [104]. Такое различие в окислительной стабильности различных мясных продуктов может быть связано с составом олеогеля. Таким образом, исследование факторов и компонентов гелеобразователей, влияющих на окислительную стабильность олеогелей и содержащих их продуктов являются в настоящее время актуальными.

## 6.1. Дизайн эксперимента

Используемые в исследовании образцы олеогелей готовили по технологии, описанной в главе 3, пункте 3.2. В качестве гелеобразователей использовали фракции, полученные согласно методике, описанной в главе 5. Композиционный состав олеогелей представлен в таблице 13.

Таблица 13. Композиционный состав исследуемых образцов

Образец	Компоненты, %					
	А	В	С	Д	ПВ	ПМ
ПМ	-	-	-	-	-	100
ПВ	-	-	-	-	6	94
А+В	3	3	-	-	-	94
А+В+С	2	2	2	-	-	94
А+В+Д	2	2	-	2	-	94

А - углеводороды; В – восковые моноэфиры; С - восковые эфиры / жирные спирты / свободные жирные кислоты; Д - свободные жирные спирты / свободные жирные кислоты/восковые эфиры; ПМ – подсолнечное масло;

ПВ – пчелиный воск

Для изучения окислительной стабильности использовали 4 различных типа олеогелей (компонентный состав представлен в таблице 13) и исходное подсолнечное масло (ПМ), подвергаемое нагреву, соответствующему технологии приготовления олеогелей (пункт 3.1), выступающее в качестве контроля. Образцы выдерживали в термостате (Binder FED 53, Германия) при постоянной температуре, равной 35 °С, в пробирках (5 мл) закрытых с плотно прикручивающейся крышкой для анализа степени окисления и текстуры, а также в пробирках, вместительностью 10 мл для анализа летучих соединений. Степень развития окислительных процессов оценивали по показателям: перекисное число - ПЧ, анизидиновое число - АЧ, удельный коэффициент экстинкции –  $E_{232}$  и общее окисление на каждой контрольной точке (0 суток, 2 суток, 5 суток, 7 суток,

12 суток и 20 суток). Данные методики были выбраны для контроля как первичных, так и вторичных продуктов окисления. Текстурные свойства (твердость и модуль упругости) олеогелей (спустя 0 суток, 2 суток, 5 суток, 7 суток, 12 суток и 20 суток) термостатируя после хранения в течение 2 часов при 20 °С. Накопление летучих органических соединений в процессе окисления изучали методом твердофазной микроэкстракции с ГХ-МС-идентификацией в 3 контрольных точках (0 суток, 5 суток и 20 суток).

## 6.2. Анализ жирнокислотного состава масла и олеогелей

Известно, что жирнокислотный состав масел может существенно влиять на устойчивость к окислению [137], поэтому для исключения влияния было необходимо убедиться в его единообразии среди олеогелей, в связи с чем перед началом исследования был проведен анализ жирнокислотного состава используемого масла и олеогелей (Таблица 14).

Таблица 14. Жирнокислотный состав исследуемых образцов подсолнечного масла и олеогелей, структурированных пчелиным воском и комбинациями его фракций

Жирная кислота	Содержание (мг/г образца)				
	ПМ	ПВ	А+В	А+В+С	А+В+D
Миристиновая (14:0)	1	1	1	1	1
Пальмитиновая (16:0)	60	69	69	68	67
Пальмитолеиновая (16:1 9-цис)	1	1	1	1	0
Маргариновая (17:0)	1	0	0	0	0
Стеариновая (18:0)	32	32	32	32	32
Элаидиновая (18:1 9-транс)	0	1	0	1	1
Олеиновая (18:1 9-цис)	186	183	186	184	185
Вакценовая (18:1 11-транс)	7	7	6	7	7

Таблица 14. Жирнокислотный состав исследуемых образцов подсолнечного масла и олеогелей, структурированных пчелиным воском и комбинациями его фракций

Жирная кислота	Содержание (мг/г образца)				
	ПМ	ПВ	А+В	А+В+С	А+В+D
Цис, транс-линолевая (18:2 9-цис, 12-транс)	5	5	5	5	5
Транс, цис –линолевая (18:2 9-транс, 12-цис)	4	4	3	5	5
Линолевая (18:2)	612	602	604	604	605
$\alpha$ –линоленовая (18:3 $\omega$ -3)	0	0	1	0	1
Арахидиновая (20:0)	2	2	2	3	2
Гондоиновая (20:1)	2	2	2	2	2
Бегеновая (22:0)	7	6	6	6	7
Лигноцеридовая (24:0)	2	4	2	3	4
Сумма ЖК, мг/г образца	922 <sup>a</sup>	920 <sup>a</sup>	921 <sup>a</sup>	923 <sup>a</sup>	922 <sup>a</sup>

А - углеводороды; В - моноэфиры; С - восковые эфиры/жирные спирты/свободные жирные кислоты; D - свободные жирные спирты/свободные жирные кислоты/восковые эфиры; ПМ – подсолнечное масло; ПВ – пчелиный воск. Одинаковые буквы свидетельствуют об отсутствии достоверных отличий ( $p > 0,05$ )

Определено, что линолевая кислота (C18:2) является преобладающей жирной кислотой для всех образцов, кроме нее основными являются пальмитиновая (C16:0) и олеиновая (C18:1) кислоты. Достоверных отличий между жирнокислотными составами изучаемых образцов выявлено не было. В связи с этим можно утверждать, что различия в окислительной стабильности масел будут связаны не с жирнокислотным составом, а с другими факторами, для выяснения которых были проведены дальнейшие исследования.

### 6.3. Определение устойчивости олеогелей к окислению

В данном разделе представлены сведения о накоплении продуктов окисления, в зависимости от вносимого гелеобразователя и времени хранения. Для оценки окислительной стабильности, образцы олеогелей и исходного подсолнечного масла подвергали ускоренному окислению при 35 °С в течение 20 дней. Рисунок 28 (a-d) отражает характер накопления первичных и вторичных продуктов окисления исходного подсолнечного масла и олеогелей на его основе. Согласно работе [129] для точной оценки степени окисления образца должны определяться как первичные, так и вторичные продукты окисления. Выявлено, что накопление продуктов окисления во всех образцах имеет ожидаемый экспоненциальный характер с выраженной точкой начала резкого повышения содержания продуктов окисления (рисунок 28 a-d).

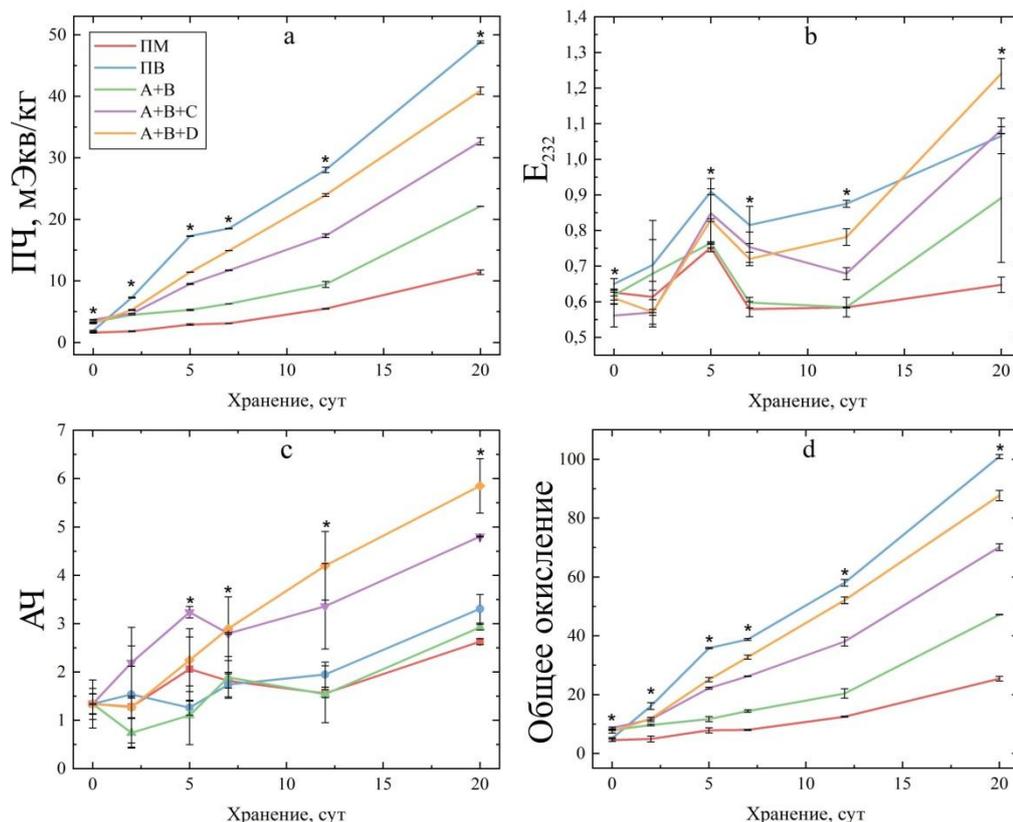


Рисунок 28. Изменение показателей перекисного числа (ПЧ) (а), удельного коэффициента экстинкции ( $E_{232}$ ) (б), анизидинового числа (АЧ) (с) и общего окисления (д) при окислении подсолнечного масла (ПМ) и олеогелей на основе пчелиного воска и его фракций при хранении. ПВ – пчелиный воск; А – углеводороды; В – моноэфиры; С – восковые эфиры/свободные спирты/свободные жирные кислоты; D – жирные спирты/свободные жирные кислоты/восковые эфиры. Звездочкой обозначены достоверные отличия ( $p < 0.05$ ) между образцами на контрольной точке

Показано, что отличия между группами для всех показателей были статистически значимыми ( $p < 0,05$ ). Исключение составило значение АЧ, не имевшее отличий до 5х суток эксперимента. Как правило, показатель ПЧ в диапазоне от 1 до 5 мЭкв/кг свидетельствует о низкой степени развития окисления, тогда как значения от 5 до 10 мЭкв/кг и выше 10 мЭкв/кг - о средней и высокой соответственно [130]. В нашем исследовании, все образцы после приготовления имели уровень ПЧ в образцах от  $1,59 \pm 0,07$  мЭкв/кг до  $3,68 \pm 0,04$  мЭкв/кг, что говорит о низкой степени развития окисления в них. Согласно

рисунку 28а, содержание перекисных соединений во всех образцах, включая подсолнечное масло, к концу исследования превышало 10 мЭкв/кг, который, при этом, существенно отличался от образца к образцу. Наименьший уровень накопления первичных продуктов окисления к концу исследования продемонстрировал образец исходного подсолнечного масла  $11,41 \pm 0,37$  мЭкв/кг, а среди образцов олеогелей наименьшим значением обладал олеогель А+В с показателем  $22,13 \pm 0,02$  мЭкв/кг. Самое высокое значение перекисного числа было обнаружено в образце, структурированном исходным пчелиным воском, и было равно  $48,80 \pm 0,20$  мЭкв/кг. Выявлено, что основными критическими точками резкого роста перекисного числа были точки 5 и 12 суток.

При анализе содержания конъюгированных диенов, для всех образцов было отмечено резкое возрастание их содержания (рисунок 28b), предшествующее росту перекисного числа (рисунок 28а), что согласуется с представлениями о механизмах накопления перекисных соединений – [138]. В первой контрольной точке (0 сутки) содержание конъюгированных диенов среди всех образцов варьировалось от минимального  $0,56 \pm 0,03$  в образце А+В+С до максимального  $0,65 \pm 0,02$  в образце, структурированном пчелиным воском. К концу исследования (20 сутки) наименьшим показателем обладал образец исходного подсолнечного масла с показателем  $0,65 \pm 0,02$  и наибольшее содержание определено в образце А+В+D со значением  $1,24 \pm 0,04$ .

Вторичные продукты окисления, содержание которых определяет показатель анизидинового числа, представляют собой продукты разложения гидропероксидов [139]. Характер накопления вторичных продуктов окисления отличался от накопления первичных продуктов окисления (рисунок 28с). Так, например, наибольшее значение анизидинового числа к концу эксперимента отмечено для образца А+В+D ( $5,85 \pm 0,56$ ), наименьшее - для образца подсолнечного масла и равно  $2,63 \pm 0,06$ . Среди олеогелей наименьшим значением характеризовался образец, структурированный фракцией А+В с показателем равным  $2,92 \pm 0,06$ . Как видно из рисунка 28с, для данного показателя характерны высокие значения стандартных отклонений. Отличия

динамики накопления анизидинового числа от динамики накопления перекисного числа могут быть связаны с присутствием летучих органических веществ в воске, которые способны снижать значение анизидинового числа, согласно работе [140]. Как показали авторы работы, ряд летучих веществ, особенно в составе лимонного и ванильного ароматизаторов, способны существенно снизить данный показатель.

Значение общего окисления рассчитывается с помощью первичных и вторичных продукты окисления, отражая начальную и более поздние стадии окисления масла, тем самым обеспечивая более точную оценку прогрессирующего окисления масла. Меньший уровень общего окисления указывает на большую устойчивость образцов к окислительному прогорканию [141]. Расчет показателя общего окисления (рисунок 28d) свидетельствует о том, что в рамках нашего эксперимента наибольшую роль играет накопление первичных продуктов окисления. Общее накопление продуктов окисления по своему характеру повторяет накопление перекисных соединений. В каждой контрольной точке при исследуемой температуре хранения равной 35 °С, происходило увеличение данного показателя для всех образцов. Значение общего окисления на 20 сутки исследования уменьшалось в ряду: ПВ > А+В+D > А+В+С > А+В > ПМ. На конечной контрольной точке, равной 20 суткам, наибольшее значение данного показателя было достигнуто в образце ПВ и составляло  $100,90 \pm 0,69$ . Наименьшее значение показателя было определено в образце подсолнечного масла и составляло  $25,45 \pm 0,80$ . Среди олеогелей лучший результат показал образец А+В, для которого значение общего окисления к концу эксперимента составило  $47,18 \pm 0,10$ .

Образец исходного подсолнечного масла согласно всем методам оценки, проявил себя наиболее стабильным к окислению, что противоречит некоторым имеющимся исследованиям. Например, в работах [142] и [132] масла, структурированные восками, показали большую сохранность относительно неструктурированных масел, однако в этих исследованиях использовались другие виды масел, что может быть определяющим фактором. Противоречивые

результаты окислительной стабильности также могут быть обусловлены разной природой происхождения восков и степенью их чистоты.

Полученные данные показывают, что развитие окислительных процессов в олеогелях, структурированных комбинациями фракций пчелиного воска происходит медленнее, по сравнению с олеогелями на исходном пчелином воске. Однако, по сравнению с неструктурированным подсолнечным маслом, олеогели показали заметно более низкую устойчивость к окислению.

#### **6.4. Характеристика летучих органических соединений**

Наиболее токсичными продуктами окисления масел и жиров являются летучие карбонильные соединения, специфичные для отдельных жирных кислот. Данные вещества также влияют на результаты измерений пара-анизидинового числа. С целью выявления различий в их накоплении, нами был проведен анализ профиля летучих органических соединений в образцах. Согласно исследованию [143] в маслах в качестве продуктов окисления могут содержаться, в том числе альдегиды, которые, как известно, способны оказывать негативное воздействие на организм при их употреблении в пищу, поэтому важно контролировать уровень их содержания. Данные из таблицы 15 свидетельствуют о том, что в процессе окисления в образцах масла и олеогелей образуются уникальные наборы вторичных продуктов окисления. Большинство летучих органических соединений представлено альдегидами, кетонами и в меньшей степени - спиртами и терпенами. Основной жирной кислотой во всех изучаемых образцах является линолевая (C18:2) жирная кислота, продуктами окисления которой являются альдегиды пентаналь, гексаналь, 2-октеналь, 2-нонаналь, 2,4-декадиеналь [138]. Из указанных альдегидов нами были обнаружены только пентаналь, гексаналь и 2,4-декадиеналь альдегид. Гексаналь был обнаружен во всех образцах, при этом наибольшее его накопление отмечено в олеогеле на основе пчелиного воска. Пентаналь также был обнаружен преимущественно в образце олеогеля ПВ.

Продукты окисления олеиновой кислоты (октаналь и нонаналь), напротив, в большем количестве обнаружены в образцах олеогелей на основе фракций воска. Самое высокое содержание октанала и нонанала отмечено для образца олеогеля А+В. Однако, как видно из таблицы 4, образцы на основе пчелиного воска и его фракций имели изначально высокие уровни содержания альдегидов. Полученные данные свидетельствуют о том, что высокие значения перекисного и анизидинового чисел для образца олеогеля на пчелином воске связано преимущественно с окислением линолевой кислоты. Накопление кетонов было характерно для образцов с фракциями А+В+С и А+В+D. При этом образец А+В+D имел высокое содержание 4-гидрокси-4-метил-2-пентанон уже в начале исследования, увеличивающееся при хранении. Основными спиртами, обнаруженными в спектре летучих органических соединений, являются 1-гексанол, 1-октанол и 1-нонанол. В подсолнечном масле при хранении данные спирты не обнаружены, что согласуется с тем, что они не являются известными продуктами окисления основных жирных кислот подсолнечного масла [138]. Тем не менее, они входят в профиль летучих веществ воска и меда – [144,145], и, по-видимому, являются нативными компонентами воска и его фракций в составе олеогеля. Основным терпеном в изучаемых образцах является dl-лимонен, который может влиять на значение анизидинового числа в маслах, в соответствии с работой [140], обуславливая различия в динамике накопления перекисного и анизидинового чисел. Наибольшее содержание данного терпена отмечено для образца А+В, что может обуславливать более низкие значения анизидинового числа для данного образца по сравнению с другими олеогелями.

Таблица 15. Летучие органические соединения в исследуемых образцах масла и олеогелей при хранении, на исходной контрольной точке 0 сутки, на 5 сутки и на 20 сутки хранения ( $1 \times 10^7$ , количество ионов)

Группа	Компонент	Rt, мин	ПМ			ПВ			А+В			А+В+С			А+В+D		
			0 сут	5 сут	20 сут												
Альдегиды	Пентаналь	18,145	0,04	0,07	0,05	0,10	0,10	0,15	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	Гексаналь	22,443	0,13	0,20	0,19	0,30	0,34	0,64	0,59	0,50	0,46	0,44	0,49	0,45	0,21	0,24	0,24
	Гептаналь	26,593	0,03	0,04	0,04	0,06	0,06	0,07	0,33	0,24	0,24	0,24	0,22	0,19	0,14	0,15	0,12
	Октаналь	30,519	n/o	0,00	0,02	0,09	0,09	0,09	0,77	0,52	0,54	n/o	0,47	0,47	0,32	0,34	0,31
	2-Гептеналь	31,937	0,01	0,04	0,06	0,21	0,37	0,49	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	0,06	0,11	0,16
	Нонаналь	34,206	n/o	0,01	0,01	0,04	0,06	0,08	0,64	0,38	0,40	0,45	0,02	0,02	0,29	0,27	0,22
Кетоны	4-Метил-3-пентен-2-он	24,576	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	0,24	n/o	n/o	0,29	n/o	n/o	2,46	2,47	2,65
	3-Гексен-2-он	27,749	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	0,06	n/o	n/o	0,31	0,31	0,32
	4-Гидрокси-4-метил-2-пентанон	33,333	0,01	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	0,20	n/o	n/o	36,57	31,98	40,49
	2,6-Диметил-2,5-гептадиен-4-он	37,88	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	0,18	0,17	0,22	0,23	0,24
Спирты	1-Гексано́л	32,357	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	0,04	0,05	0,05	0,05	0,06
	1-Октано́л	39,096	n/o	n/o	n/o	0,12	0,13	0,09	0,21	0,09	0,06	0,15	0,05	0,07	0,11	0,13	0,01
	1-Нонано́л	42,201	n/o	n/o	n/o	0,03	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	0,04	n/o	n/o	0,05	n/o	0,05
Терпены	dl-Лимонен	27,205	n/o	n/o	n/o	0,04	0,02	0,02	0,12	0,07	0,08	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05

## 6.5. Определение периода индукции

Для исключения влияния структуры олеогеля на устойчивость к окислению и непосредственной оценки роли гелеобразователя проводили исследования окислительной стабильности образцов при температуре выше точек плавления гелеобразователей, температуры которых описаны в главе 4, рисунок 15. В работе [132], было показано, что при температурах свыше 90 °С, использование традиционных показателей перекисного числа и конъюгированных диенов не является надежным индикатором развития окислительных процессов из-за быстрого превышения предела измерения методики. В связи с этим, нами был использован метод прямого потребления кислорода в реакторе Oxitest. Окислительная стабильность была выражена посредством периода индукции, который представляет собой промежуток времени до начала резкого увеличения скорости окисления липидов, согласно [146]. На основании результатов данного исследования был сделан вывод о про- или антиоксидантном эффекте гелеобразователя в составе олеогелей. Были исследованы образцы исходного подсолнечного масла (ПМ), а также олеогели на основе пчелиного воска (ПВ) и олеогелей на основе отдельных комбинаций фракций (A+B); (A+B+C); (A+B+D) для определения периода индукции и поиска возможных корреляций с другими результатами исследований. На рисунке 29 показано, что образцы с использованием фракций имели больший период индукции, чем образец на основе воска.

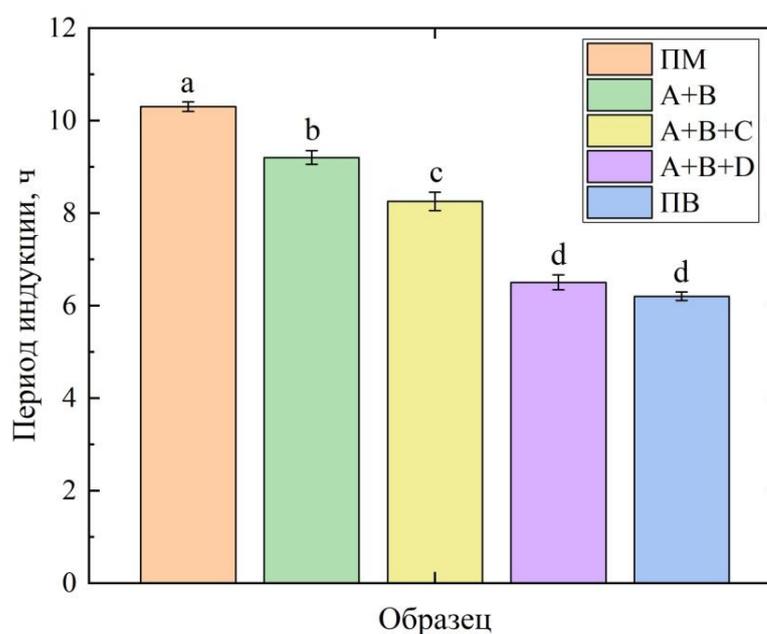


Рисунок 29. Период индукции подсолнечного масла (ПМ), олеогелей на основе пчелиного воска (ПВ) и комбинаций его отдельных фракций (A+B); (A+B+C) и (A+B+D) при температуре 90 °С. Одинаковыми буквами обозначены образцы, не имеющие достоверных различий ( $p > 0,05$ )

Согласно рисунку 29, наибольшим периодом индукции среди олеогелей обладал образец A+B, а среди всех образцов – подсолнечное масло. Согласно полученным результатам можно предположить наличие веществ, проявляющих прооксидантные свойства в составе используемого воска. Коллектив авторов [132] предположил, что прооксидантное действие не обусловлено углеводородами или восковыми эфирами, но связано с минорными компонентами, в том числе свободными жирными кислотами. Роль свободных жирных кислот как прооксидантов в маслах подтверждается в работе [147]. Полученные нами данные подтверждают данное предположение в связи с тем, что наименьшую окислительную стабильность проявили образцы с наибольшим содержанием свободных жирных кислот, а именно A+B+D (13,8% свободных жирных кислот) и ПВ (20,5% свободных жирных кислот). Также прооксидантное действие может быть связано с наличием других неидентифицированных веществ.

### 6.6. Определение поведения текстурных свойств олеогелей при хранении

Для проверки гипотезы о влиянии текстуры исследуемых олеогелей на окислительную стабильность, исследовали изменение показателей твердости и модуля упругости (E), полученных на универсальной испытательной машине Shimadzu. Твердость одно из важнейших функциональных свойств шортенингов, структурированных масел или их аналогов - олеогелей, согласно [148]. При замене твердых жиров структурированными маслами, важно уделять внимание показателю их твердости как сразу после изготовления, так и в процессе хранения.

Полученные результаты по исследованию изменения показателя твердость в процессе хранения представлены на рисунке 30. Получено, что все образцы на основе комбинаций отдельных фракций обладали большей твердостью по сравнению с образцом, структурированным исходным воском (от 0 до 20 сут).

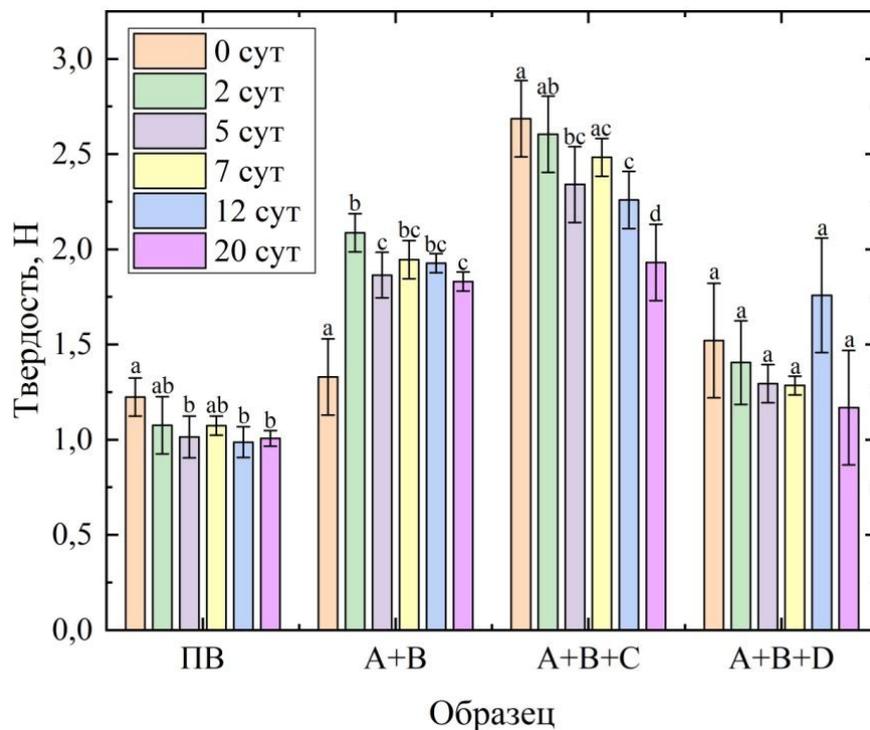


Рисунок 30. Изменение показателя «Твердость» олеогелей при хранении в течение 20 суток

Более высокие значения показателя твердости считается желательным свойством олеогеля, поскольку это дает возможность использовать меньшее количество гелеобразователя для достижения схожих физических свойств. Ранее при изучении текстуры олеогелей, структурированных пчелиным воском и его отдельными фракциями было показано, что при 6% содержании пчелиного воска формируются олеогели с «удовлетворительно пластичными и намазываемыми» свойствами. При этом использование фракций позволяет получить более прочные олеогели, вплоть до «твердый, предел намазываемости». В нашем исследовании, среди образцов, структурированных комбинациями фракций, наиболее высокий результат продемонстрировал олеогель на комбинации A+B+C, что может быть связано с увеличенным содержанием в нем восковых эфиров по сравнению с образцами A+B и A+B+D, что согласуется с исследованием [2]. Среди образцов, полученных на основе комбинаций фракций, наименьшей твердостью обладал образец A+B+D, имеющий в своем составе большое количество спиртов, способных снижать гелеобразующие свойства, что согласуется с работой [2]. Снижение текстурных свойств олеогелей за счет увеличения содержания спиртов также показано в главе 4, при этом одновременное добавление небольшого количества фракции, содержащей свободные жирные кислоты и спирты, к фракции углеводов и восковых эфиров приводило к образованию прочного геля, что показано в главе 5.

Результаты исследования модуля упругости на первой контрольной точке (0 сут) (рисунок 31) показали, что, как и в случае с показателем твердость, модуль упругости для образцов олеогелей на основе комбинаций фракций был выше относительно исходного пчелиного воска.

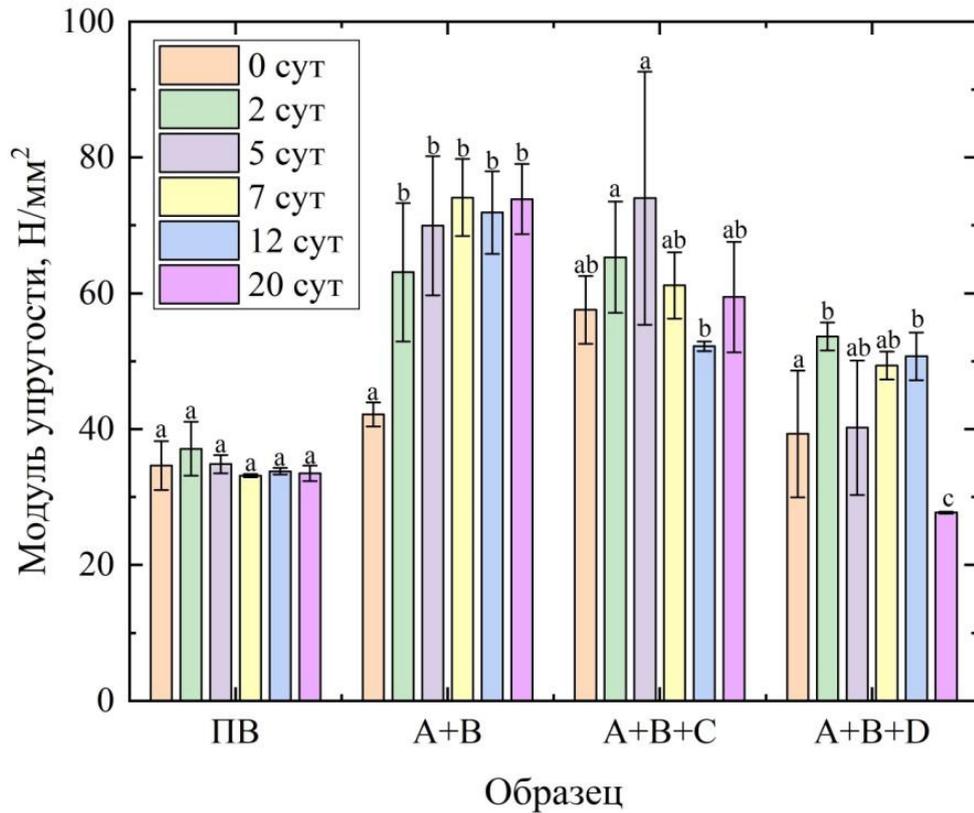


Рисунок 31. Изменение модуля упругости олеогелей в процессе хранения в течение 20 суток

Согласно рисунку 31, спустя 2 суток модуль упругости для олеогелей на комбинациях фракций A+B; A+B+C и A+B+D увеличился. По прошествии 5 суток, увеличение значения модуля упругости продолжилось для образцов A+B и A+B+C. На 7-е и 12-е сутки значительных изменений не было выявлено. На последней контрольной точке, соответствующей 20 суткам, образец A+B+D обладал наименьшим значением модуля упругости. Отличительной особенностью олеогелей на основе пчелиного воска и на основе комбинации фракций углеводородов и моноэфиров является то, что значение модуля упругости на протяжении всего эксперимента незначительно варьировалось ( $p > 0,05$ ) начиная со 2 суток

## 6.7. Корреляционный анализ

На заключительном этапе работы была проведена оценка влияния различных гелеобразователей на окислительную стабильность олеогелей. В качестве интегрального показателя развития окислительных процессов в образцах олеогелей использовали значение начальной скорости накопления продуктов окисления при хранении от начала эксперимента до 2 суток. Была изучена корреляция результатов работы с данным показателем. На рисунке 32 показаны наиболее сильные взаимосвязи.

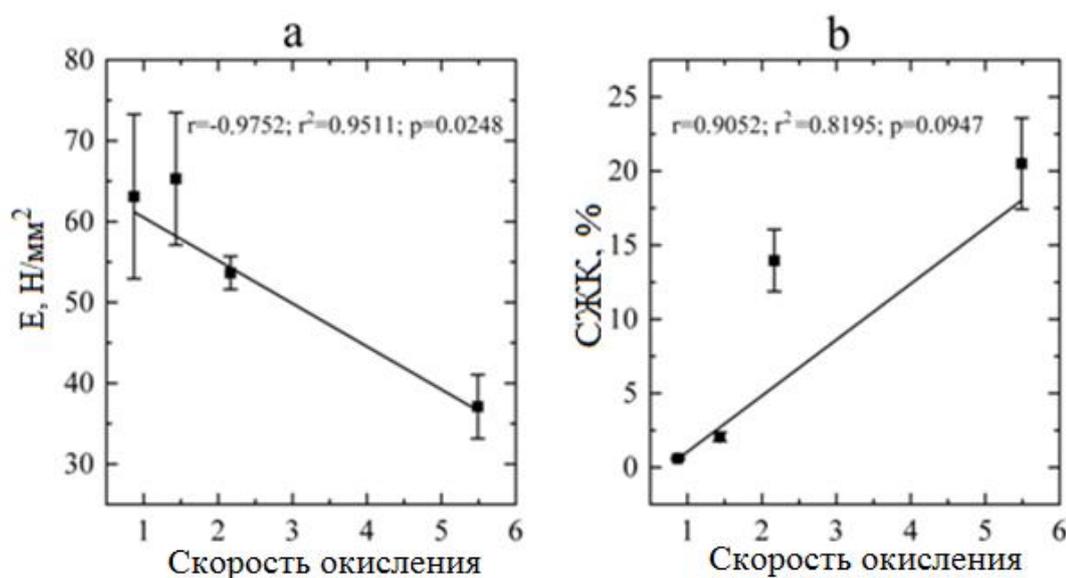


Рисунок 32. Зависимость модуля упругости (а) и содержания свободных жирных кислот (б) от скорости окисления олеогелей

В частности, на рисунке 32а показана тесная корреляция ( $r^2 = 0.9511$ ) с начальным значением модуля упругости для изучаемых образцов. Выявлена обратно пропорциональная зависимость, т. е. при повышении модуля упругости снижалась скорость накопления продуктов окисления. Полученная закономерность согласуется с результатами, полученными [142] свидетельствующими о положительной корреляции между прочностью и окислительной стабильностью олеогелей. Данный эффект может быть связан со снижением диффузии кислорода в толщу олеогеля при высоких значениях прочности олеогеля – [132]. Выявленная корреляция (рисунок 32а) может

объяснить противоречия между полученными нами данными по окислению с результатами работ [142] и [132]. Как показано в главе 3, масла с большим содержанием длинноцепочечных и очень длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот образуют гели с повышенной прочностью. В работах [142] и [132] использовались масла с большим содержанием ненасыщенных жирных кислот по сравнению с нашим исследованием. В связи с этим окислительная устойчивость олеогелей на их основе могла быть выше устойчивости исходного масла. Таким образом, подтверждена гипотеза о влиянии текстуры на развитие окислительных процессов в олеогелях.

На рисунке 32b показана зависимость содержания свободных жирных кислот в составе гелеобразователей от скорости окисления. Показано наличие тенденции к повышению скорости накопления продуктов окисления при повышении содержания свободных жирных кислот. В исследовании [149] было показано, что свободные жирные кислоты могут повышать скорость накопления продуктов окисления за счет их большей мобильности в образце. Аналогичная зависимость отмечена и для эксперимента в реакторе окислительной стабильности OXITEST (рисунок 33).

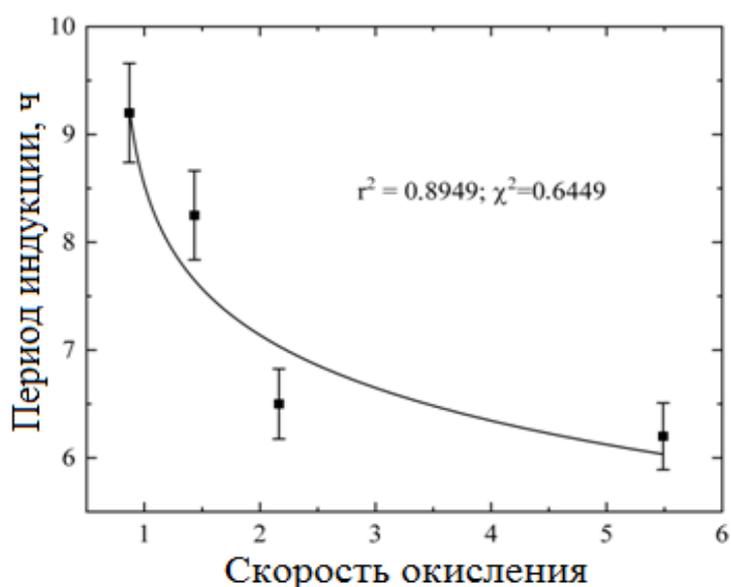


Рисунок 33. Зависимость периода индукции от скорости окисления олеогелей

Выявлено, что показатель периода индукции находится в обратной экспоненциальной зависимости от скорости окисления олеогелей, что является ожидаемым, в связи с различиями в порядке химической реакции. Автоокисление масел при нормальных условиях протекает как реакция первого порядка – [150,151], при этом ограничивающей является концентрация алкильных радикалов, а скорость реакции зависит от концентрации кислорода экспоненциально. В свою очередь, окисление при высоких концентрациях кислорода (как в реакторе OXITEST) не зависит от его концентрации, в связи с чем протекает как реакция нулевого порядка – [152] с линейной зависимостью.

Зависимость между содержанием свободных жирных кислот и периодом индукции в составе гелеобразователя также имеет обратную экспоненциальную связь (рисунок 34), таким образом, что повышение содержания свободных жирных кислот существенно снижает период индукции.

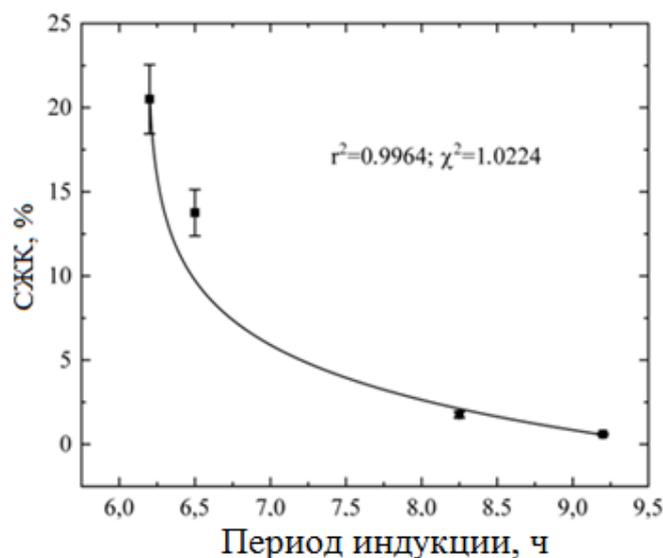


Рисунок 34. Зависимость периода индукции от содержания свободных жирных кислот в составе олеогелей

При этом достоверных взаимосвязей между показателем период индукции и модулем упругости не выявлено. Это обусловлено тем, что измерение в реакторе проводили выше температуры плавления образцов. В связи с тем, что нами отмечены схожие закономерности в скорости окисления олеогелей как в структурированном виде, так и в расплавленном виде следует предположить, что

структура олеогеля и содержание прооксидантов одновременно играют важную роль в окислительной стабильности олеогелей.

Таким образом, при оценке окислительной стабильности олеогелей необходимо оценивать как влияние гелеобразователей на реологию олеогелей, так и их про- или антиоксидантную активность. Было показано, что олеогели, структурированные комбинациями фракций пчелиного воска более устойчивы к окислению, чем олеогель на пчелином воске. Тем не менее, по сравнению с неструктурированным подсолнечным маслом, все олеогели показали низкую устойчивость к окислению. Особенности использования различных комбинаций фракций пчелиного воска являются существенные различия в профиле летучих веществ свежеприготовленных образцов, а также образцов после хранения, что может приводить к занижению измеряемого показателя пероксидазного числа. В результате проведенных работ показана тесная взаимосвязь содержания свободных жирных кислот (отрицательная) и модуля упругости (положительная) с развитием окислительных процессов в олеогелях. При этом содержание свободных жирных кислот тесно коррелирует с результатами исследования окислительной стабильности в реакторе OXITEST. Подтверждена гипотеза о корреляции окислительной стабильности олеогелей с их модулем упругости при температуре ниже температуры плавления олеогелей. При этом показано, что в данных системах при температуре выше точки плавления олеогелей некоторые гелеобразователи (в частности свободные жирные кислоты) способны снижать окислительную стабильность олеогеля независимо от его структуры. В связи с этим, можно говорить о вкладе одновременно нескольких факторов на развитие окислительных процессов в олеогелях. Полученные результаты показывают, что использование фракций пчелиного воска по сравнению с самим пчелиным воском приводит к получению жиросодержащих продуктов с более высокой устойчивостью к окислению.

## ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ D<sub>3</sub> И K<sub>2</sub> НА СВОЙСТВА ОЛЕОГЕЛЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СОХРАННОСТИ

Материалы, опубликованные в данном разделе представлены в публикациях [153–155].

Взрослое население в Российской Федерации имеет дефицит витамина D имеет от 23,4% до 96,6% [156]. Недостаточная обеспеченность населения России витамином D (холекальциферол) обусловлена сразу несколькими факторами - низкий уровень его эндогенного синтеза и ограниченное поступление с пищевыми продуктами [157,158]. Дефицит витаминов, в частности холекальциферола, в организме ассоциируется с рядом проблем, таких как снижение эластичности сосудов, гипертрофия миокарда, артериальная гипертензией, атеросклероз, нарушение секреции инсулина, риски сердечнососудистых заболеваний (ССЗ), сахарного диабета 2 типа, метаболического синдрома, ожирения и других [159–161]. На решение проблемы, связанной с обеспеченностью витаминами направлены такие подходы как обогащение пищевой продукции массового потребления [162], и биофортификация [163]. В данном контексте олеогели могут рассматриваться как новая возможность доставки эссенциальных микронутриентов в пищевой продукт [153,155].

Использование олеогелей в пищевой промышленности для снижения доли насыщенных жирных кислот подразумевает, в частности, замену животных жиров на растительные. Данная замена призвана снизить риски развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), однако при замене животных жиров на растительные масла может произойти существенная потеря витаминов D<sub>3</sub>, K<sub>2</sub> (менахинон) и других биологически активных жирорастворимых веществ, обладающих протекторным действием в отношении ССЗ. Предотвращение такой потери может быть достигнуто путем включения этих эссенциальных веществ в состав олеогеля, однако это может отразиться на гелеобразующих свойствах олеогелей. Помимо возможного влияния данных витаминов на гелеобразующие

свойства существует проблема возможной деструкции данных витаминов, связанная с технологическими особенностями приготовления олеогелей, которые согласно главе 3, пункту 3.2 подразумевает нагревание до 90 °С. Также известно, что менахинон (витамин К<sub>2</sub>) может быть неустойчив при ультрафиолетовом воздействии. В связи с этим для выявления роли жирорастворимых витаминов D<sub>3</sub> и К<sub>2</sub> в составе олеогелей была проведена работа в двух направлениях. Первое направление исследований связано с выявлением влияния данных витаминов на гелеобразующие свойства олеогелей, второе – на изучение их сохранности при разработке, а также при хранении под ультрафиолетовым воздействием.

### **7.1. Изучение влияния витаминов D<sub>3</sub> и К<sub>2</sub> на процесс гелеобразования**

На первом этапе изучали влияние жирорастворимых витаминов D<sub>3</sub> и К<sub>2</sub> на гелеобразование. Для изучения влияния введенных в состав олеогелей витаминов D<sub>3</sub> и К<sub>2</sub> на гелеобразующие свойства были получены олеогели по технологии описанной в главе 3, пункте 3.2. Количество вносимых витаминов составило 1 мг/г для витамина D<sub>3</sub> и для витамина К<sub>2</sub>. Высокие концентрации витаминов были использованы для лучшего выявления их возможного эффекта на свойства олеогелей. В качестве гелеобразователей были использованы: пчелиный воск (ПВ) и комбинация фракций (КФ). В качестве комбинаций фракций (КФ) была использована смесь, формирующая олеогели со слабыми текстурными свойствами, представляющая собой сочетание углеводов, восковых эфиров (ди-, триэфиры), а также свободных жирных кислот и спиртов. В качестве контрольных образцов выступали олеогели, структурированные теми же соединениями, но не содержащие данные витамины.

### 7.1.1. Визуальная оценка

На рисунке 35 показано, что все образцы, при переворачивании спустя 24 часа хранения при 23°C (скорость охлаждения 1°C/мин) характеризовались гелеобразным (нетекучим) состоянием.

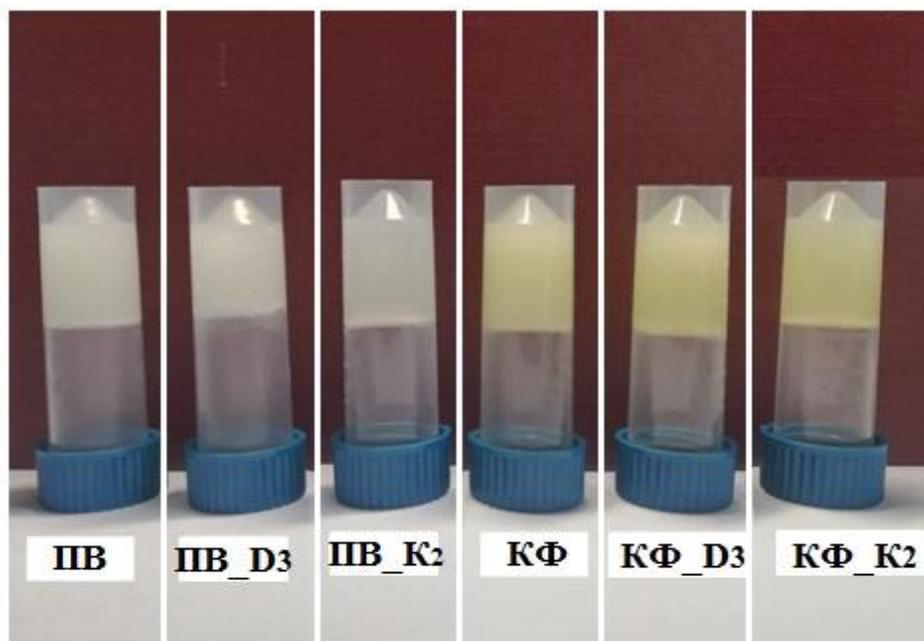


Рисунок 35. Внешний вид олеогелей на пчелином воске (ПВ) и на комбинации фракций (КФ) с добавлением витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>

Таким образом, согласно рисунку 35, введение витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> в состав исследуемых олеогелей при визуальной оценке не привело к изменению гелеобразного состояния. Стоит отметить, что среди олеогелей отчетливо видны цветовые отличия, обусловленные используемым цветом используемого гелеобразователя. В данном случае олеогели, структурированные ПВ имели прозрачно-белый цвет, в то время как олеогели, структурированные комбинацией фракций (КФ) имели желтоватый оттенок. Цвет восковых фракций был представлен ранее в главе 4, пункт 4.2.1.

### 7.1.2. Анализ микроструктуры

Для более детального понимания влияния витаминов  $D_3$  и  $K_2$  на процесс гелеобразования за счет изменения морфологических особенностей кристаллов в образующихся олеогелях была использована световая поляризационная микроскопия. Анализ морфологии кристаллов олеогелей показан на рисунке 36.

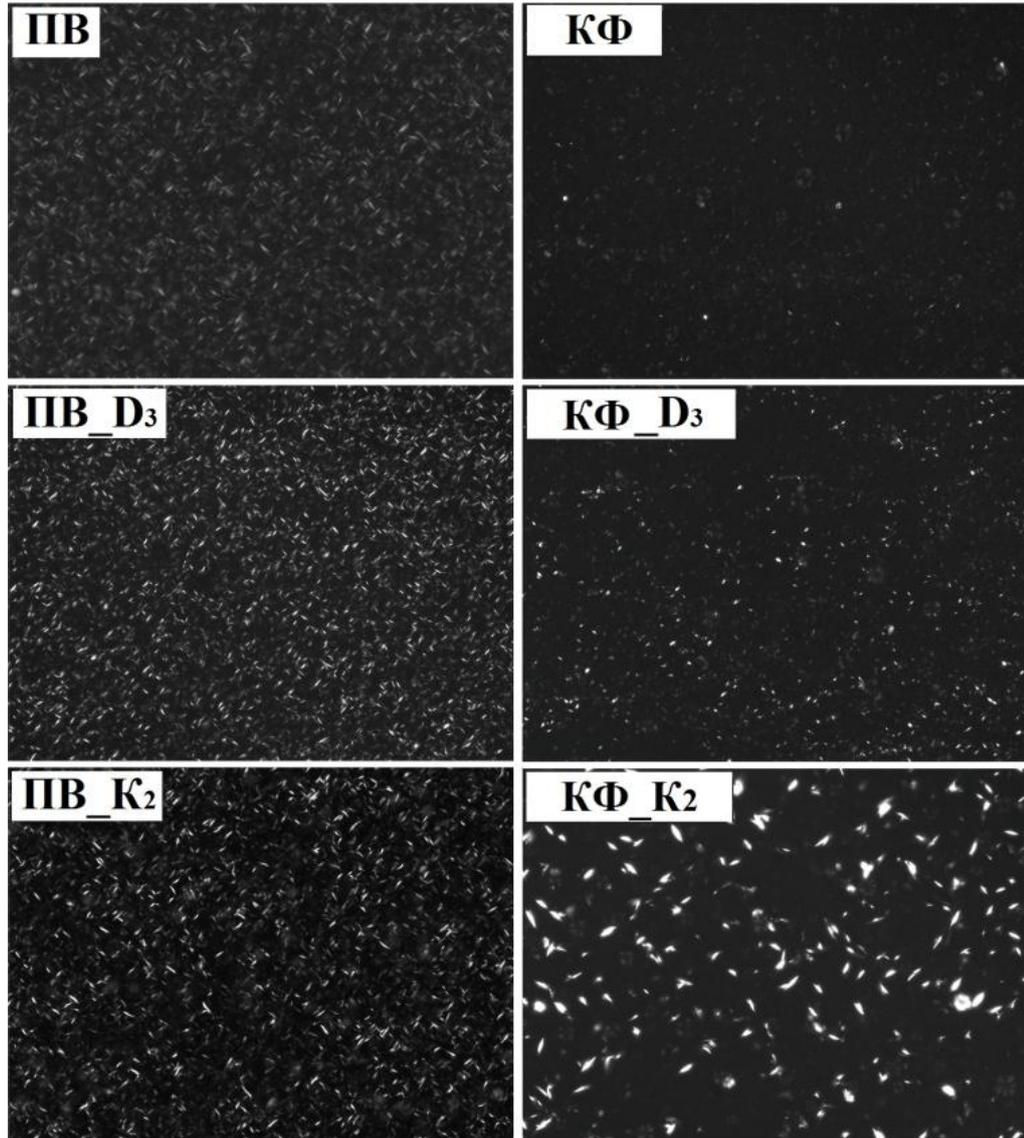


Рисунок 36. Световая поляризационная микроскопия олеогелей, структурированных пчелиным воском (ПВ) и комбинацией фракций (КФ), с добавлением витамина  $D_3$  и  $K_2$

Согласно рисунку 36, среди образцов без внесения витаминов, но структурированных различными веществами видны отличительные особенности морфологии кристаллов, что свидетельствуют о влиянии природы гелеобразователя. Подобный эффект изменения морфологии кристаллов за счет гелеобразователя был представлен в работах [3,115] а также в данном исследовании в главах 4 и 5, что говорит о значительной роли дисперсной фазы в формировании морфологических особенностей кристаллов. Согласно рисунку 36 видно, что при внесении витамина  $D_3$  и  $K_2$  кристаллы некоторых образцов олеогелей изменяют свою форму и размер кристаллов, что повлечет за собой изменение функционально-технологических свойств [164]. Так, при внесении витамина  $D_3$  в состав олеогеля, структурированного ПВ и КФ, достоверного изменения размеров кристаллов не происходит. На основании результатов микроскопии выявлено, что внесение витамина  $K_2$  не влияет на форму и размер кристаллов, формируемых в олеогелях, структурированных пчелиным воском. В олеогелях, структурированных комбинацией фракций (КФ), форма образующихся кристаллов была аналогичной кристаллам, образующихся в олеогелях, структурированных пчелиным воском, при этом внесение витамина  $K_2$  в состав олеогеля КФ привело к увеличению размеров кристаллов.

### **7.1.3. Определение маслосвязывающей способности**

Маслосвязывающая способность (МСС) является важным свойством, на которое всегда ориентируются при разработке олеогелей. Способность исследуемых олеогелей к удерживанию масла и влияние витаминов  $D_3$  и  $K_2$  на эту способность оценивали путем центрифугирования и по дальнейшему расчету количества отделившегося масла. При этом высокая МСС говорит о большем количестве связанного масла. Результаты определения МСС исследуемых олеогелей представлены на рисунке 37.

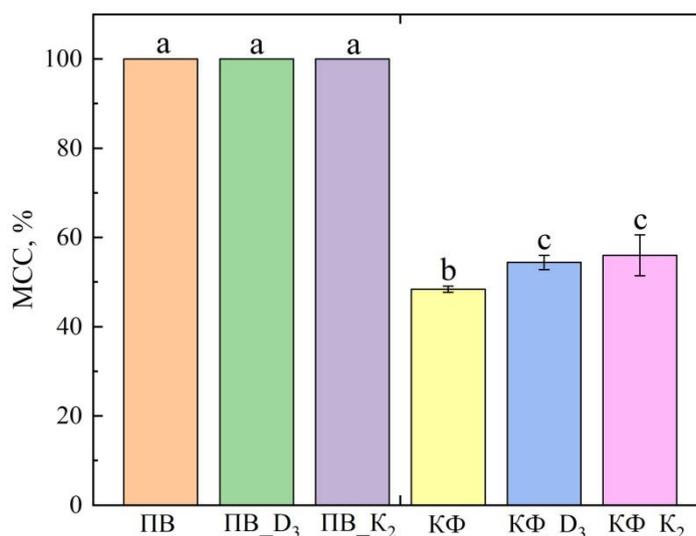


Рисунок 37. Маслосвязывающая способность олеогелей с добавлением витамина D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>

На рисунке 37 показано, что введение витамина D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> в состав олеогелей, структурированных пчелиным воском, не влияет на МСС. Повышение способности связывать масло при введении исследуемых витаминов отмечено в образце олеогелей, структурированных комбинацией фракций (КФ).

Полученные результаты могут быть связаны с визуально более запутанной сетью кристаллов олеогелей ПВ (рисунок 36), которая согласно [164] может оказывать влияние на способность к связыванию масла. Более детальное определение влияния витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> на гелеобразующие свойства олеогелей, структурированных пчелиным воском и комбинацией его фракций было проведено посредством исследования текстурных свойств.

#### 7.1.4. Определение текстурных свойств

На следующем этапе была проведена оценка текстурных свойств (твердости и модуля упругости) олеогелей в присутствии витаминов. Согласно полученным данным показателя твердости (рисунок 38) видно, что в образце олеогеля, структурированного пчелиным воском имел значение (1,48 Н), при этом при

добавлении витамина  $D_3$  происходило достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение твердости до (0,85 Н).

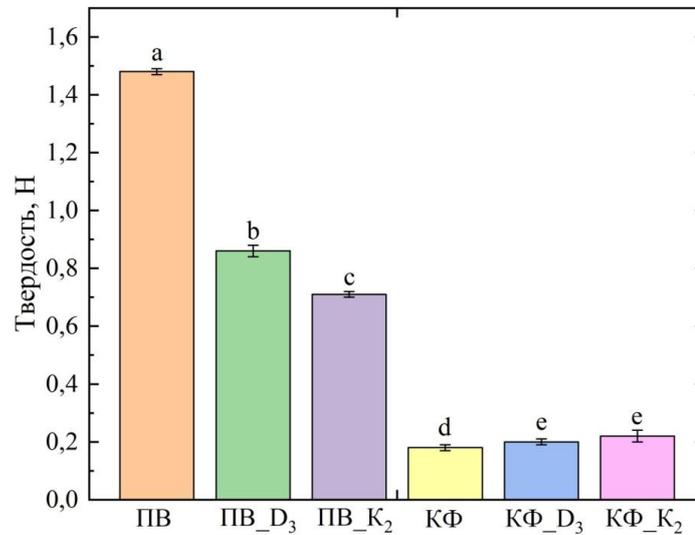


Рисунок 38. Показатель твердости (Н) олеогелей на основе подсолнечного масла, структурированных пчелиным воском (ПВ) и комбинацией фракций (КФ) с добавлением витаминов  $D_3$  и  $K_2$

Олеогели, структурированные комбинациями фракций КФ демонстрировали незначительное увеличение твердости при добавлении витамина  $D_3$  с 0,18 Н в исходном образце, до 0,23 Н, при этом данные олеогели характеризовались самыми низкими структурно-механическими показателями среди всех образцов. Для воскового олеогеля введение витамина  $K_2$  приводило к значительному снижению твердости до 0,63Н. Добавление витамина  $K_2$  в олеогель с применением КФ в качестве структурообразователя приводило к незначительному повышению твердости. Результаты определения модуля упругости представлены на рисунке 39.

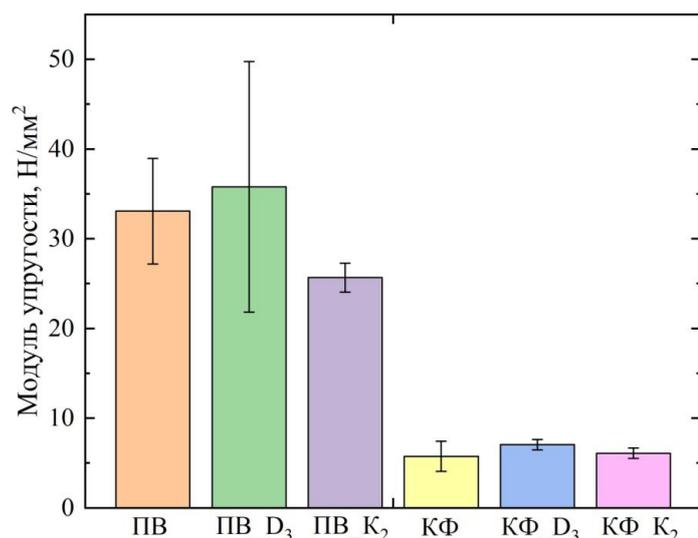


Рисунок 39 . Показатель модуля упругости (Н/мм<sup>2</sup>) олеогелей на основе подсолнечного масла, структурированных пчелиным воском (ПВ) и комбинацией фракций (КФ), с добавлением витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>

Согласно рисунку 39 видно, что добавление витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> на олеогели, структурированные воском приводили как к увеличению, в случае витамина D<sub>3</sub>, так и к снижению, в случае присутствия витамина K<sub>2</sub>. Положительный эффект внесения витаминов на изменение модуля упругости был обнаружен в олеогелях, структурированных комбинациями фракций (КФ).

В связи с тем, что при получении данных олеогелей использовался один тип дисперсионной среды (подсолнечное масло), то полученные эффекты, вероятно, связаны с взаимодействием исследуемых витаминов и гелеобразователя при кристаллизации. Таким образом, можно заключить, что добавление витаминов негативно отразилось на свойствах олеогелей, структурированных пчелиным воском, но при этом улучшило свойства олеогелей на комбинации фракций пчелиного воска.

## 7.2. Изучение сохранности витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> при хранении в составе олеогелей

На следующем этапе была изучена возможность использования олеогелей в качестве носителей биологически активных веществ, в частности жирорастворимых витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>. При изучении сохранности витаминов в качестве воздействующих факторов рассматривали отличия в используемой при приготовлении емкости и воздействие ультрафиолета. На первом этапе было проведено сравнение отличий в емкостях, используемых при приготовлении (светлое стекло и темное стекло). Второй этап заключался в сравнении уровня сохранности вносимых жирорастворимых витаминов в олеогеле и в неструктурированном подсолнечном масле. При приготовлении олеогелей была использована наименьшая возможная продолжительность нагрева, равная 10 минутам [43]. В качестве гелеобразователя был использован исходный пчелиный воск. Количество вносимых витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> составило 1 мг/г. Полученные данные представлены в таблице 16.

Таблица 16. Сохранность витаминов в зависимости от типа используемой емкости

Тип емкости	Сохранность витамина D <sub>3</sub> , %	Сохранность витамина K <sub>2</sub> , %
Светлое стекло	63,2 ± 9,5 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
Темное стекло	89,9 ± 13,5 <sup>a</sup>	88,5 ± 8,9 <sup>a</sup>

Разными буквами обозначены образцы, отличающиеся друг от друга (p < 0,05)

Согласно таблице 16, показано, что использование емкости из светлого стекла при приготовлении олеогелей с внесенными витаминами привело практически к полному разрушению витамина K<sub>2</sub> (сохранность 2,3%) и значительному разрушению витамина D<sub>3</sub> (сохранность 63,2%). При этом при использовании емкости из темного стекла обеспечена сохранность витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> на уровне ~ 88-89 %. Таким образом определено, что для изготовления

олеогелей, содержащих витамины, целесообразно использовать светонепроницаемую емкость.

Дальнейший эксперимент по изучению сохранности витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> в олеогелей и неструктурированном подсолнечном масле был проведен в климатической камере КК240 при постоянной температуре равной 23 °С и под воздействием ультрафиолетовой лампы (15Вт) в течение 90 минут. Полученные результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17. Изучение сохранности витаминов D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> при хранении в составе олеогеля и неструктурированного масла с идентичным жирнокислотным составом

<b>Образец</b>	<b>Сохранность витамина D<sub>3</sub>, %</b>	<b>Сохранность витамина K<sub>2</sub>, %</b>
Масло 0 мин	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Масло 30 мин	78,1 <sup>b</sup>	40,7 <sup>b</sup>
Масло 90 мин	61,4 <sup>e</sup>	21,2 <sup>d</sup>
Олеогель 0 мин	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Олеогель 30 мин	98,2 <sup>a</sup>	43,2 <sup>b</sup>
Олеогель 90 мин	84,5 <sup>f</sup>	27,3 <sup>e</sup>

Одинаковыми буквами обозначены образцы, не имеющие достоверных различий ( $p > 0,05$ )

Содержание витаминов в исходной точке (0 минут) было принято за 100% (таблица 17). Согласно результатам, представленным в таблице 17, образцы масла и олеогеля характеризовались резким снижением содержания витамина K<sub>2</sub> в первые 30 минут проведения эксперимента до уровня 40,7 % и 43,2 % соответственно. Динамика изменения сохранности данного витамина спустя 60 и 90 минут значительно снизилась и к концу эксперимента составила в среднем 21,2% и 27,3% для неструктурированного масла и для олеогеля соответственно. Снижение сохранности витамина D<sub>3</sub> в образце неструктурированного масла спустя 30 минут эксперимента происходило значительно быстрее, чем в олеогеле

и была равна 78,1%. Сохранность витамина  $D_3$  для олеогеля на данной контрольной точке составляла 98,2%. На следующих контрольных точках наблюдалось дальнейшее снижение содержания витамина для обоих образцов, но с меньшей скоростью, относительно предыдущей точки. К концу исследования, сохранность витамина  $D_3$  в олеогеле составляла в среднем 84,5% против 61,4% для образца масла. Наблюдаемые различия в динамике сохранности витаминов могут быть обусловлены различием в способности к связыванию данных витаминов со гелеобразователями в составе олеогеля, а также отличающимися факторами их деструкции. Предполагается, что витамин  $D_3$  образует более устойчивые комплексы с компонентами пчелиного воска по сравнению с витаминами  $K_2$ , что может обуславливать его большую защиту от воздействия ультрафиолетового излучения.

В результате проведенного исследования определено, что наименьшая деструкция витаминов при производстве наблюдается в емкости из темного стекла. Установлено, что в течение 90 минут воздействия ультрафиолетом олеогель показывает сохранность витамина  $D_3$  на 20% выше относительно неструктурированного подсолнечного масла. При использовании олеогеля также показана более высокая сохранность витамина  $K_2$ . Установлено, что воздействие ультрафиолета в меньшей степени влияет на витамин  $D_3$ , при этом существенно разрушая витамин  $K_2$ . Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования олеогелей в качестве основы для обогащения витаминами  $D_3$  и  $K_2$ . Дальнейший поиск способов повышения сохранности витаминов  $D_3$  и  $K_2$  в представленных липидных системах будет способствовать более эффективной профилактике дефицита данных витаминов.

## **ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА ЖИРОВОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОЛЕОГЕЛЯ, СТРУКТУРИРОВАННОГО ВОСКОВЫМИ КОМПОНЕНТАМИ**

Материалы, опубликованные в данном разделе представлены в публикациях [165–171].

В последнее десятилетие количество исследований, связанных с изучением олеогелей резко увеличилось, при этом более ранние исследования в основном были акцентированы на фундаментальных свойствах олеогелей, в то время как современные исследования также направлены и на изучение возможности их использования в технологии пищевых продуктов в качестве альтернативы твердого жира [169]. Область применения олеогелей в пищевой промышленности является развивающимся направлением, но уже имеются положительные результаты использования олеогелей в рецептуре пищевых продуктов с целью частичной или полной замены твердых жиров [168]. В настоящее время возможность замены твердого жира в продуктах была применена к различным видам пищевых продуктов, например кондитерские изделия, среди которых маффины, печенье, сосиски, колбасы, бургеры, а также маргарины, шортенинги, спреды и т.д. [17,33,55,166–169,171,172]. Значительно увеличивающееся количество исследований посвященных замене твердых жиров олеогелями говорит о перспективности дальнейших разработок в этой области. Учитывая, что согласно исследованию [173] пчелиный воск способен проявлять эмульгирующие свойства - его применение в технологии производства пищевых продуктов, в которых необходимо использование эффективных эмульгаторов выглядит наиболее перспективным. В этом контексте необходима разработка продукта, традиционный состав которого характеризуется высоким содержанием твердых жиров и наличием эмульгаторов. В качестве такого продукта может быть выбран растительно-жировой спред. Растительно-жировой спред представляет собой эмульсионный жировой продукт, в составе которого присутствуют 2 фазы – жировая (в том числе олеогели) и водная, смешанные посредством воздействия

механических сил, способствующих образованию мелких капель, а также с использованием соединений, действующих на границах раздела, снижая, таким образом, межфазное натяжение. В качестве механических сил может быть использована гомогенизация.

Традиционные олеогели, структурированные восками имеют высокие температуры плавления, что может сказаться на нежелательном восковом налете во рту при употреблении [68], поэтому при их использовании в рецептуре спредов важно контролировать данный параметр и корректировать в случае необходимости. Как было показано в главе 5, комбинации фракций пчелиного воска могут быть эффективным гелеобразователем для олеогелей с возможностью модификации различных свойств в зависимости от компонентного состава и соотношения используемых фракций. Так, например, согласно главе 4 было показано, что путем использования углеводов с другими фракциями можно получать эвтектические системы, обладающие сниженными температурами плавления, что может способствовать снижению нежелательного воскового налета во рту при употреблении продуктов на основе олеогелей, структурированных подобными комбинациями.

Таким образом, задача данного исследования заключалась в разработке и исследовании пищевого жирового продукта (растительно-жирового спреда) с заменой твердого жира на олеогель, структурированный пчелиным воском или его компонентами.

Для приготовления спредов были выработаны олеогели по технологии, описанной в пункте 3.2. Были приготовлены 2 олеогеля: на исходном пчелином воске (ПВ) и на сочетании пчелиного воска и углеводов в соотношении 9:1, обозначенный как образец на восковых компонентах (ВК).

### 8.1 Исследование жирнокислотного состава липидных систем

Определен состав жирных кислот используемых липидных систем, среди которых заменитель молочного жира (ЗМЖ), олеогель на пчелином воске (олеогель ПВ) и олеогель на восковых компонентах (олеогель ВК), указанных в таблице 18.

Таблица 18. Жирнокислотный состав липидных систем

<b>Жирная кислота</b>	<b>ЗМЖ</b>	<b>Олеогель ПВ</b>	<b>Олеогель ВК</b>
Капроновая (6:0)	0,02	-	-
Каприловая (8:0)	0,20	-	-
Каприновая (10:0)	0,17	-	-
Лауриновая (12:0)	1,40	-	-
Миристиновая (14:0)	1,30	0,09	0,11
Пентадекановая (15:0)	0,06	-	-
Пальмитиновая (16:0)	34,88	7,50	7,41
Гексадеценовая (16:1)	0,03	-	-
Пальмитолеиновая (16:1, 9 – цис)	0,15	0,12	0,11
Маргариновая (17:0)	0,09	0,04	0,05
Гептадеценовая (17:1)	0,03	-	-
Стеариновая (18:0)	4,06	3,41	3,38
Элаидиновая (18:1, 9 – транс)	0,10	0,06	0,06
Олеиновая (18:1, 9 – цис)	32,85	20,48	20,52
Вакценовая (18:1, 11 – транс)	0,69	0,68	0,71
Октадеценовая (18:1, 11 – цис)	0,01	-	-
Цис, транс-линолевая (18:2, 9 – цис, 12 – транс)	0,19	0,40	0,42
Транс, цис-линолевая (18:2, 9 – транс, 12 – цис)	0,17	0,35	0,31

Таблица 18. Жирнокислотный состав липидных систем

<b>Жирная кислота</b>	<b>ЗМЖ</b>	<b>Олеогель ПВ</b>	<b>Олеогель ВК</b>
Линолевая (18:2)	22,70	65,04	65,09
$\alpha$ -Линоленовая (18:3)	0,13	0,11	0,13
Арахидовая (20:0)	0,30	0,16	0,15
Гондоиновая (20:1)	0,13	0,14	0,14
Бегеновая (22:0)	0,22	0,83	0,85
Лигноцериновая (24:0)	0,11	0,48	0,40
Общее количество, % от суммарного содержания жирных кислот			
<b>НЖК</b>	42,81 <sup>a</sup>	12,51 <sup>b</sup>	12,35 <sup>b</sup>
<b>ПНЖК</b>	23,19 <sup>a</sup>	65,90 <sup>b</sup>	65,95 <sup>b</sup>
<b>МНЖК</b>	33,99 <sup>a</sup>	21,42 <sup>c</sup>	21,48 <sup>c</sup>

НЖК – насыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты. Отличающиеся буквы a,b,c свидетельствуют о различиях среди образцов ( $p > 0,05$ )

Согласно полученным данным видно, что образцы олеогелей по сравнению с заменителем молочного жира характеризовались меньшим количеством насыщенных жирных кислот (НЖК) и мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК), но повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Достоверных отличий между составом жирных кислот среди образцов олеогелей не обнаружено, поэтому для дальнейших расчетов будет использовано среднее значение состава жирных кислот двух олеогелей.

## 8.2 Изучение текстурных свойств липидных систем

На данном этапе были оценены текстурные свойства липидных систем: заменителя молочного жира (ЗМЖ), олеогеля на пчелином воске и олеогеля на

восковых компонентах. Результаты текстурного анализа представлены в таблице 19.

Таблица 19. Текстуальные свойства липидных систем

Образец	Твердость (Н)	Модуль упругости, Н/мм <sup>2</sup>
ЗМЖ	5,31 ± 0,23 <sup>a</sup>	82,94 ± 3,35 <sup>a</sup>
Олеогель ПВ	0,14 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,58 ± 0,40 <sup>b</sup>
Олеогель ВК	0,37 ± 0,02 <sup>c</sup>	7,18 ± 0,79 <sup>c</sup>

Отличающиеся буквы a,b,c свидетельствуют о различиях среди образцов (p>0,05)

Согласно полученным данным отчетливо видна разница между текстурными свойствами заменителя молочного жира (ЗМЖ) и олеогелей. Твердость ЗМЖ составляла 5,31 ± 0,23 Н, для олеогелей данный показатель был существенно ниже: 0,14 ± 0,02 Н для олеогеля ПВ и 0,37 ± 0,02 Н для олеогеля ВК. Аналогичная зависимость была выявлена для модуля упругости. Так, модуль упругости ЗМЖ составлял 82,94 ± 3,35 Н/мм<sup>2</sup>, для олеогеля ПВ 2,58 ± 0,40 Н/мм<sup>2</sup> и 7,18 ± 0,79 Н/мм<sup>2</sup> для олеогеля ВК. Интересно, что прием, связанный с повышением доли углеводов привел к увеличению текстурных показателей олеогелей более чем в 2 раза. О подобных приемах успешного комбинирования нескольких гелеобразователей восковой природы сообщалось ранее в главе 5, а также в исследованиях [3,174]. Столь существенная разница между ЗМЖ и применяемыми для их замены олеогелями может отразиться на свойствах разрабатываемого спреда на основе данных липидных систем, в особенности на текстурных свойствах.

### 8.3. Технология выработки жирового продукта

В качестве исследуемого жирового продукта был выбран растительно-жировой спред. Согласно [44], в рецептуре растительно-жирового спреда

содержание молочного жира составляет менее 15%. Общее содержание жира в продукте было выбрано равным 82,5%. Спред, приготовленный с использованием заменителя молочного жира «Эколакт» представлял собой базовую рецептуру. В качестве контрольного образца были выработаны спреды на олеогеле (3% пчелиного воска) с заменой от 10% до 50% ЗМЖ. Образцы обозначались как К10-К50 с увеличением доли олеогеля соответственно. Данная концентрация гелеобразователя в составе олеогеля была выбрана на основании исследования [174]. Для сравнения также был приготовлен образец спреда с использованием 30% неструктурированного подсолнечного масла, что соответствовало средним значениям, однако он быстро становился мягким при комнатной температуре, в связи с чем его дальнейшее сравнение с другими образцами было нецелесообразно. В качестве опытных образцов выступали спреды, в составе которых использовали от 10% до 50% олеогеля, структурированного восковыми компонентами (10% фракция углеводов : 90% исходный пчелиный воск, при общей концентрации гелеобразователя 3%) с целью регулирования свойств конечного продукта, в частности снижение температуры плавления и избавление от воскового привкуса. Решение об увеличении доли углеводов в составе гелеобразователя было принято на основании результатов, продемонстрированных в главе 5. Добавление фракции углеводов объясняется их наименьшей тугоплавкостью среди всех восковых компонентов. Для выработки 11 образцов спреда были использованы рецептуры, представленные в таблице 20.

Таблица 20. Рецептурный состав спредов

Ингредиенты/ образец	Базовый	К10	К20	К30	К40	К50	О10	О20	О30	О40	О50
	Масс.%										
<b>Масляная фаза (82,5%)</b>											
Подсолнечное масло	-	7,94	15,89	23,83	31,78	39,72	7,94	15,89	23,83	31,78	39,72
Пчелиный воск	-	0,25	0,49	0,74	0,98	1,23	0,22	0,44	0,67	0,88	1,11
Фракция углеводородов	-	-	-	-	-	-	0,03	0,05	0,07	0,10	0,12
ЗМЖ	81,9	73,71	65,52	57,33	49,14	40,95	73,71	65,52	57,33	49,14	40,95
Соевый лецитин	0,10										
Моноглицериды	0,50										
<b>Водная фаза (17,5%)</b>											
Вода	14,96										
Сухое обезжиренное молоко	2,00										
Соль	0,15										
Лимонная кислота	0,02										
Сорбиновая кислота	0,07										
Ароматизатор	0,30										
<b>Итого</b>	<b>100,00</b>										

Учитывая, что жирность спредов составляет 82,5%, то рекомендованная порция, соответствующая 100 ккал, будет содержать в себе от 35 мг до 172 мг компонентов пчелиного воска в зависимости от доли олеогеля. В соответствии с нормативами JECFA (Объединённый экспертный комитет ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам) суточное потребление пчелиного воска (E901) в количестве менее 650 мг не оказывает негативного воздействия [175].

Для приготовления образцов спреда основывались на методике применяли методике, описанной ранее [174], однако были внесены дополнительные модификации. Первоначально готовили масляную фазу путем нагревания предварительно подготовленного олеогеля в стеклянном стакане на водяной бане при 80°C, к которому впоследствии добавляли заменитель молочного жира, соевый лецитин и моноглицериды, постоянно перемешивая с помощью магнитной мешалки на низкой скорости (около 300 об/мин). Водную фазу готовили путем добавления соли, сорбиновой кислоты, сухого обезжиренного молока, ароматизатора и лимонной кислоты в стеклянный стакан с водой, выдерживаемый на водяной бане при 80 °C при постоянном перемешивании с использованием магнитной мешалки на скорости 300 об/мин. Следующий этап заключался в постепенном добавлении водной фазы к масляной фазе при постоянном перемешивании. При смешении температура масляной и водной фаз должна быть в диапазоне 60-65°C, смесь перемешивали на гомогенизаторе со скоростью примерно  $5000 \pm 100$  об/мин в течение 5 минут. Далее полученные образцы охлаждали на ледяной бане, интенсивно перемешивая до момента затвердевания. Данный подход позволяет резко охладить систему, что согласно [176] позволит снизить размер кристаллов и тем самым улучшить восприятие спреда во рту, однако стоит учитывать, что по сравнению с постепенным охлаждением это приведет к снижению текстурных характеристик. Как известно [177], кристаллизация жиров представляет собой ключевой процесс, влияющий на структуру и свойства продуктов на жировой основе, в том числе на спреды. Для проведения процесса кристаллизации образцы выдерживали 24 часа в

холодильной камере при температуре около 4 °С, после чего помещали на 48 часов в морозильную камеру при - 5°С, а затем снова возвращали в холодильник на 12 часов.

#### 8.4. Сравнение жирнокислотного состава спредов

Учитывая, что различий среди жирнокислотного состава олеогелей нет, образцы спредов с одинаковым содержанием олеогеля объединены в одну колонку, например К10 и О10. Отличия среды групп жирных кислот образцов показаны в таблице 21.

Таблица 21. Содержание различных групп жирных кислот в спредах

Жирные кислоты	Образец					
	Базовый	К10/О10	К20/О20	К30/О30	К40/О40	К50/О50
НЖК, %	35,3	32,8	30,3	27,8	25,3	22,8
Разница от базового, %	-	-7,1	-14,2	-21,3	-28,4	-35,5
ПНЖК, %	19,1	22,7	26,2	29,7	33,2	36,8
Разница от базового, %	-	18,4	36,9	55,30	73,7	92,2
МНЖК, %	28,0	27,0	26,0	24,9	23,9	22,9
Разница от базового, %	-	-3,7	-7,4	-11,1	-14,8	-18,4
ПНЖК / НЖК	0,5	0,7	0,9	1,1	1,3	1,6
МНЖК / НЖК	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	1,0

НЖК – насыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты

Таким образом, согласно полученным данным видно, что с увеличением доли олеогеля снижается содержание НЖК на 7,1 % при 10% содержании олеогеля и до 35,5% при 50% замене на олеогели. Содержание МНЖК незначительно снижалось от 3,8% при 10% замене на олеогели, до 18,4% при 50% замене. При этом увеличивается содержание ПНЖК на 18,4% при 10% замене и до 92,2% при замене 50% твердых жиров на олеогели. Замена в спредах твердого жира олеогелями приводит к более высокому соотношению ПНЖК/НЖК и в меньшей степени МНЖК/НЖК (табл. 21), что может увеличить эти соотношения в рационе человека. Увеличение этих соотношений в рационе может привести к снижению липопротеидов плотности и соотношения общего количества липопротеидов высокой плотности, а также снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний.

## **8.5. Анализ свойств жирового продукта**

### **8.5.1. Визуальная оценка**

На первом этапе была проведена визуальная оценка разработанных спредов. Согласно рисунку 41 внешний вид полученных образцов спредов практически не отличался, независимо от используемой жировой основы.



Рисунок 41. Выработанные образцы спредов. Образец с базовой рецептурой обозначен как «базовый», образцы «К10-К50» представляют собой спреды в которых от 10 до 50% жировой фазы заменено на олеогели, структурированные пчелиным воском, в образцах «О10-О50» - от 10 до 50% жировой фазы заменено на олеогели, структурированные смесью пчелиного воска и углеводов

Определено, что все образцы имели однородную поверхность без налета, поседений или отслоений.

### 8.5.2. Оценка цвета

Следующий этап заключался в количественном определении цветовых характеристик образцов приборным методом с помощью спектрофотометра. Международная комиссия по освещению (СIE) для оценки окраски рекомендует использовать систему ( $L^*a^*b^*$ ), а также индексы белизны (WI) и желтизны (YI). Таким образом, измеряемыми и вычисляемыми параметрами были:  $L^*$  — светлота (изменяется от 1 до 100, то есть от самого темного, до самого светлого),  $a^*$  — положение цвета в диапазоне от зеленого до красного,  $b^*$  — от синего до желтого. Цветовые характеристики исследуемых спредов представлены в таблице 22.

Таблица 22. Цветовые характеристики спредов

Образец	L*	a*	b*	WI	YI
Базовый	85,17 ± 0,67	2,77 ± 0,06	21,83 ± 0,49	26,54 ± 0,58	36,62 ± 0,91
K10	83,73 ± 0,45*	2,60 ± 0,10	21,70 ± 0,50	27,24 ± 0,60	37,02 ± 0,97
K20	84,50 ± 0,36	2,30 ± 0,00*	23,67 ± 0,40*	28,38 ± 0,24*	40,01 ± 0,57*
K30	83,03 ± 0,42*	2,45 ± 0,06*	23,37 ± 0,12*	28,98 ± 0,16*	40,20 ± 0,05*
K40	82,43 ± 0,31*	2,13 ± 0,06*	22,53 ± 0,06	28,65 ± 0,24*	39,05 ± 0,24*
K50	81,67 ± 0,06*	1,43 ± 0,00*	21,13 ± 0,06	28,01 ± 0,04*	36,97 ± 0,09
O10	85,80 ± 0,26	2,77 ± 0,15	23,73 ± 0,35*	27,80 ± 0,22*	39,52 ± 0,49*
O20	84,30 ± 0,46	2,30 ± 0,17*	22,23 ± 0,38	27,31 ± 0,53	37,68 ± 0,79
O30	83,47 ± 0,06*	2,23 ± 0,06*	23,27 ± 0,00*	28,63 ± 0,07*	39,82 ± 0,12*
O40	82,60 ± 0,26*	1,90 ± 0,00*	22,47 ± 0,21	28,48 ± 0,33*	38,86 ± 0,49*
O50	80,23 ± 0,06*	1,30 ± 0,00*	21,13 ± 0,06	28,97 ± 0,07*	37,63 ± 0,12

Звездочкой (\*) обозначены образцы, отличающиеся от базового ( $p > 0,05$ )

Согласно полученным данным видно, что среди образцов имеются некоторые отличия в цвете, что обусловлено изменением жировой фазы на олеогели, структурированные различными гелеобразователями. Так согласно показателю (L\*), наибольшая светлота характерна для образца с базовой рецептурой, а также для образца O10. Отмечено, что с повышением доли олеогеля в составе конечного продукта происходит снижение показателя светлоты. Аналогичная тенденция отмечена для показателя (a\*). Показатель (b\*) не имел подобной зависимости и изменялся хаотично. Наименьшее значение показателей (L\*), (a\*) и (b\*) характерно для образцов с долей олеогеля, равной 50%, как в образце K50, так и в образце O50. На основании полученных результатов были рассчитаны индексы белизны и желтизны. Индекс белизны (WI) варьировался в диапазоне от 26,54 до 28,98. Индекс желтизны (YI) варьировался от 36,62 до 40,20. Данные показатели изменяются хаотично. Несмотря на имеющиеся отличия, все образцы имели близкие значения измеряемых показателей, однако при большей замене на олеогель они могут быть выражены сильнее, в связи с чем может возникнуть необходимость в применении красителя.

### 8.5.3. Оценка текстурных свойств

Текстурные свойства представляют собой один из наиболее важных атрибутов пищевых продуктов, а когда речь идет о маргарине, сливочном масле, спреде или шортенинге - основным параметром текстуры является твердость. Под твердостью понимается максимальное усилие при проникновении индентера. Наряду с показателем твердости оценивают показатель модуля упругости (модуль Юнга). Определение текстурных свойств осуществляли с использованием 12 мм насадки цилиндрической формы путем проникновения на 10 мм внутрь образца со скоростью 10 мм/мин. Результаты оценки текстурных свойств спредов отражены в таблице 23.

Таблица 23. Текстурные свойства спредов

Образец	Твердость (Н)	Модуль упругости (Н/мм <sup>2</sup> )
Базовый	30,84 ± 9,65	1,12 ± 0,21
К10	27,74 ± 8,25	1,75 ± 0,01*
К20	28,07 ± 10,32	2,68 ± 0,26*
К30	20,65 ± 6,12	1,55 ± 0,04*
К40	10,50 ± 1,94*	0,36 ± 0,01*
К50	9,33 ± 2,73*	0,43 ± 0,05*
О10	33,71 ± 10,10	1,86 ± 0,12*
О20	26,34 ± 9,45	2,81 ± 0,25*
О30	20,49 ± 5,30	1,23 ± 0,16
О40	11,80 ± 4,56*	0,58 ± 0,05*
О50	8,32 ± 1,33*	0,68 ± 0,13*

Звездочкой (\*) обозначены образцы, отличающиеся от базового ( $p < 0,05$ )

Согласно полученным данным выявлено, что образцы спредов существенно отличаются между собой по текстурным свойствам. Показатель твердости образцов спреда существенно отличался, варьируясь от 8,32 Н ± 1,33 Н до 33,71 Н ± 10,10 Н. Наиболее приближенными по показателю твердости к образцу с базовой рецептурой были спреды, содержащие не более 30% олеогеля в своем составе, не имеющие достоверных отличий. Образцы с содержанием олеогеля 40

и 50% (K40, K50, O40 и O50) имели более низкие показатели твердости и модуля упругости. Значения модуля упругости варьировались в диапазоне от  $0,36 \text{ Н/мм}^2 \pm 0,01 \text{ Н/мм}^2$  до  $2,81 \text{ Н/мм}^2 \pm 0,25 \text{ Н/мм}^2$ . По показателю модуля упругости, образцы, с содержанием олеогеля равным 20% (K20 и O20) обладали наибольшими значениями модуля упругости, что характеризует их как более пластичные. И напротив, образцы с более высоким содержанием олеогеля равным 40% и 50% характеризовались меньшей пластичностью. Наиболее приближенным по значению модуля упругости к базовой рецептуре был образец O30, структурированный комбинацией восковых компонентов (исходный пчелиный воск и фракция углеводов). Согласно данным по определению текстурных свойств липидных систем (таблица 19), олеогель на восковых компонентах имел твердость более чем в 2 раза выше, чем олеогель на пчелином воске, при этом значительной разницы в текстуре спредов с применением данных олеогелей не выявлено. Аналогичный результат был обнаружен в исследовании [174], где большой вклад вносит не твердость олеогелей, а природа гелеобразователей и их итоговая концентрация в системе. Тем не менее, отчетливо видно снижение текстурных свойств спредов, как твердости, так и модуля упругости с повышением доли олеогелей, особенно при содержании 40 и 50% олеогеля. Предполагается, что на изменение текстурных свойств спредов могут воздействовать второстепенные компоненты, входящие в их рецептуру, например моноглицериды, лецитин и другие, которые по-разному влияют на кристаллообразование пчелиного воска и его компонентов, присутствующих в составе олеогеля. Несмотря на то, что значение модуля упругости в ЗМЖ в несколько десятков раз выше, чем в олеогелях (таблица 19) – некоторые образцы спредов с применением олеогелей (преимущественно образцы с содержанием олеогеля 10 и 20%) имели выше значения данного показателя. Вероятно, это может быть обусловлено высокими значениями модуля упругости пчелиного воска, входящего в состав олеогелей [178].

Таким образом, предполагается, что для большей замены твердого жира без отличий текстурных свойств от базового образца, требуются олеогели с более

высоким содержанием гелеобразователя. В связи с этим для каждого конкретного типа продуктов нужно строго подходить к выбору используемого олеогеля.

#### 8.5.4. Определение термических свойств

Использование рецептуры спредов с добавлением углеводов подразумевает снижение температуры плавления за счет его меньшей тугоплавкости по сравнению с пчелиным воском. Полученные результаты определения термических характеристик спредов представлены на рисунке 42.

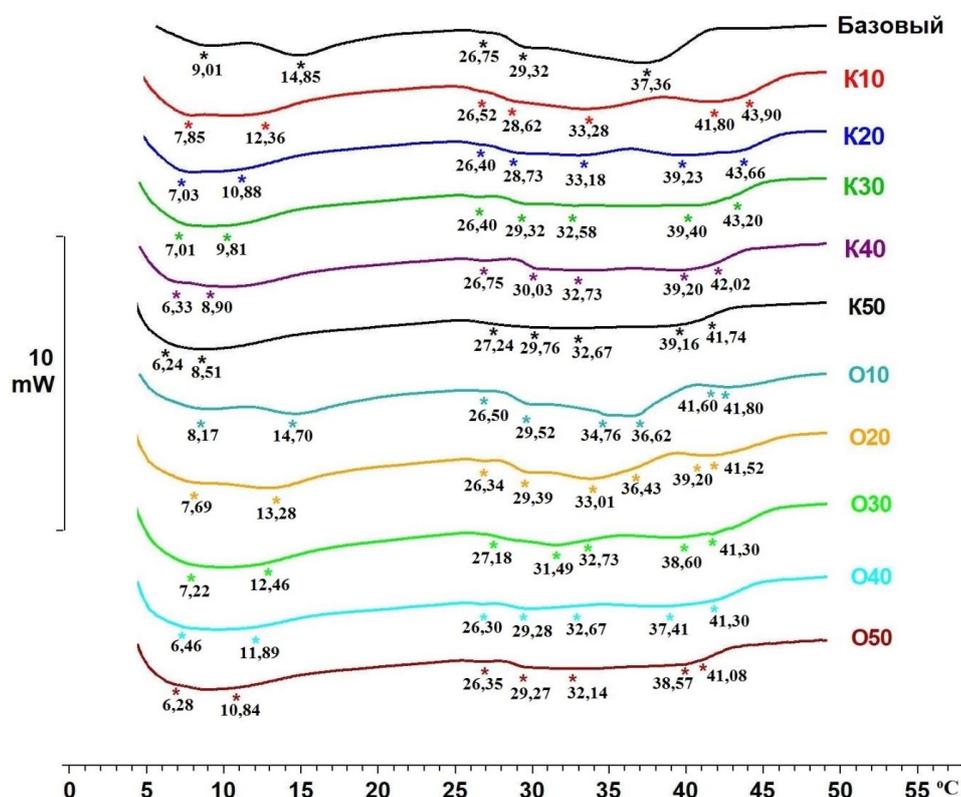


Рисунок 42. Термограмма плавления спредов

Согласно рисунку 42 видно, что во всех образцах спредов наблюдается большое количество пиков плавления (5-8 пиков), что говорит о многокомпонентности системы. Наименьшим количеством пиков (5) характеризуется базовый образец; в спредах с присутствием восковых компонентов количество пиков значительно выше (от 7 до 8 пиков). Пики, не присутствующие в базовом образце обусловлены компонентами пчелиного воска,

обладающие высокой тугоплавкостью (глава 4, пункт 4.2.5). При этом известно, что при снижении концентрации гелеобразователя происходит снижение тугоплавкости олеогеля. Наибольший пик плавления базового образца равен 37,36 °С. При увеличении доли олеогелей (от 10 до 50%) данный пик смещается в сторону меньших температур, однако появляются пики, характерные восковым компонентам. Так, например, в образце K10 это пики плавления 41,80 и 43,90 °С, а в образце O10 это пики 41,60 и 41,80 °С, представленные на рисунке 42. В частности обнаружено, что при добавлении углеводородов к пчелиному воску происходит снижение температуры плавления. Это было обнаружено при сравнении образцов K10-K50 (без добавления углеводородов) и O10-O50 (с добавлением углеводородов). Так, образцы с большей долей углеводородов (O10-O50), характеризовались более низкими температурами плавления пиков, присущих восковым компонентам. Это объясняется тем, что фракция углеводородов менее тугоплавкая, чем исходный воск (глава 4, пункт 4.2.5) и соответственно увеличение доли менее тугоплавкого компонента приводит к снижению температуры плавления некоторых пиков плавления в системе. Наряду с температурами плавления была оценена энтальпия ( $\Delta H$ ), представленная на рисунке 43.

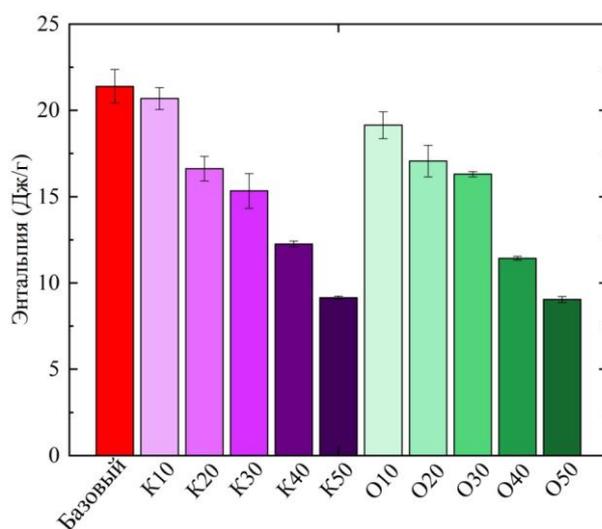


Рисунок 43. Энтальпия плавления спредов

Согласно рисунку 43 видно, что при увеличении доли олеогелей происходит снижение энтальпии плавления. Это связано с тем, что мы заменяем твердые

жиры (ЗМЖ), обычно обладающие высокими значениями энтальпии плавления на олеогели, энтальпия плавления которых значительно меньше, за счет присутствия большого количества жидкого масла, не обладающего тепловыми эффектами в данном диапазоне температур. Наименьшими значениями энтальпии характеризовались образцы с максимальным содержанием олеогеля, равным 50% (К50 и О50). Этим также объясняется снижение текстурных показателей описанных выше (таблица 20). Отмечено, что значения энтальпии имеют тесную положительную корреляцию с показателем твердости ( $r^2=0,83$ ). Так, более твердые образцы характеризовались большими значениями энтальпии. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности изменения температур плавления и энтальпии спредов в зависимости от используемой жировой фазы, в частности, от применяемых гелеобразователей.

#### **8.5.5. Органолептический анализ**

При разработке пищевых продуктов на основе олеогелей и дальнейшей оценке их органолептических характеристик, зачастую отмечается наличие вкуса и аромата характерного воску, за счет чего снижается общая приемлемость продуктов. Согласно данным по определению летучих ароматических соединений, представленных в главе 4, пункт 4.2.3, вещества, входящие во фракцию углеводов в основном характеризуются дескрипторами: «восковый», «свежий», «жирный» и «мягкий». Остальные компоненты, присутствующие в пчелином воске характеризуются как «восковый», «цветочный», «альдегидный», «розовый», «цитрусовый», «резкий», «растворитель» и «землистый». Таким образом, увеличивая содержание фракции углеводов будет происходить изменение набора ароматических соединений, по сравнению с нативным воском, что приведет к корректировке ароматического профиля и может повлиять на органолептические характеристики.

На заключительном этапе был проведен органолептический анализ разработанных образцов спредов для выявления характеристик, влияющих на их восприятие. Экспертная сенсорная оценка является важным показателем при разработке пищевых продуктов [171]. Оценку проводили в соответствии с ГОСТ 34178-2017. В качестве оцениваемых показателей были использованы «Вкус и запах», «Консистенция при  $(12\pm 2)^\circ\text{C}$  и внешний вид» и «Цвет», которые экспертная группа оценивала по 5 балльной шкале. Характеристика каждого показателя указана в таблице 24.

Таблица 24. Критерии оценки жирового продукта

<b>Наименование показателя</b>	<b>Характеристика</b>
Внешний вид и консистенция	Пластичная, однородная, плотная или мягкая. Поверхность среза блестящая, слабоблестящая или матовая, сухая на вид
Цвет	От белого до светло-желтого, однородный по всей массе, или обусловленный внесенными добавками. Допускается наличие вкраплений внесенных вкусоароматических добавок
Вкус и запах	Сливочный, сладкосливочный или кислосливочный*. При использовании пищевкусовых и ароматических добавок — привкус и запах, свойственный внесенным добавкам

\* По требованию потребителя в растительно-жировых спредах и топленых смесях допускается обезличенный вкус и запах

В результате проведенного исследования составлена лепестковая диаграмма оцениваемых параметров, представленная на рисунке 44.

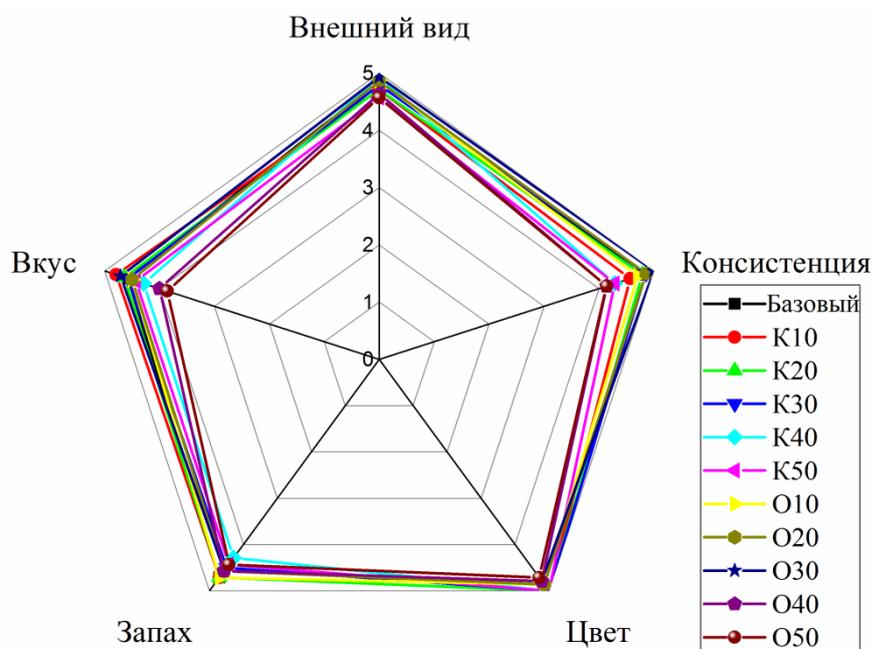


Рисунок 44. Лепестковая диаграмма органолептической оценки спредов

Согласно рисунку 44 все образцы отмечены высокими оценками экспертной группы. Самыми высокими значениями показателя «Внешний вид» характеризовались сразу несколько образцов спредов, среди которых Базовый, O30 и K40. Наименьшие значения были выявлены в образцах K50 и O50. Сниженные текстурные свойства спредов, содержащих 40 и 50% олеогеля (таблица 20) отразились и на жировом продукте, в результате чего были получены более низкие оценки показателя «Консистенция». Данный показатель был одним из наиболее отличающихся среди всех. Выявлено, что при увеличении доли олеогеля до 40 и 50% как в контрольных образцах, так и в опытных отмечено снижение «Консистенции» продукта. Экспертной группой отмечено, что образцы (K40, K50, O40 и O50) были мягче остальных. Максимальным значением данного показателя характеризовался образец O30 (5,00). В образце с базовой рецептурой и образцах K10-K50 отмечены наиболее высокие значения показателя «Цвет». Незначительное снижение оценок «Цвета» в образцах O10-O50 может быть обусловлено тем, что добавляемая фракция углеводов имеет прозрачно-белый цвет (глава 4, пункт 4.2.1). С другой стороны, согласно определению цвета на спектрофотометре (таблица 19), достоверных отличий среди большинства

спредов не было обнаружено. Большинство экспертов отметило, что образцы спредов с долей олеогелей свыше 30% (образцы К40, К50, О40, О50) имели блестящую поверхность, что обусловлено увеличением доли восковых компонентов в данных системах, а исходный пчелиный воск, согласно ГОСТ 33308-2015, является глазирователем (Е901). Были заметны значительные отличия в показателе «Вкус». Наибольшими значениями характеризовались образцы К10 и О30, превосходящие Базовый. Высокие значения для образца О30 говорят о том, что применение углеводов привело к положительным изменениям. Тем не менее, у всех образцов с содержанием олеогелей свыше 30%, оценки показателя «Вкус» заметно снизились. Отмечено, что в образцах с долей олеогеля 50% (К50 и О50) присутствовало восковое послевкусие. Это обусловлено тем, что доля воска в данных системах возрастает, придавая продукту посторонний привкус. При оценке параметра «Запах» в образцах, с использованием до 30% олеогеля в составе, достоверных отличий от базового образца обнаружено не было, что говорит об отсутствии негативного влияния в них ароматических соединений из восковых компонентов. При этом образцы с более высокой долей олеогеля – К40, К50 и О50 были оценены ниже, что может быть связано с изменением ароматического профиля спреда вызванным соединениями, присутствующими в составе пчелиного воска или его компонентов. Предполагается, что для существенного изменения ароматического профиля оказалось недостаточным внесение доли углеводов в количестве 10% от массы гелеобразователя.

В рамках проведенных работ выявлено, что для получения спредов с представленной рецептурой рекомендуется использовать не более 30% доли олеогеля (при содержании в нем 3% восковых компонентов) в качестве жировой основы. Использование рецептур с содержанием олеогеля до 30% включительно позволит сократить содержание насыщенных жирных кислот более чем на 7 - 21%, повысить содержание полиненасыщенных жирных кислот на 18 - 55 %, но на 11% сократить мононенасыщенные жирные кислоты. Таким образом, благодаря использованию олеогелей разработаны растительно-жировые спреды со сниженным содержанием насыщенных жирных кислот и повышенным

содержанием полиненасыщенных жирных кислот, а также характеризующиеся сопоставимыми физическими и органолептическими характеристиками со спредом, приготовленным с использованием традиционного жирового компонента.

В рамках диссертационного исследования в августе 2023 года в производственных условиях ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты» была произведена промышленная выработка опытной партии (15кг) растительно-жирового спреда с использованием нового жирового компонента – олеогеля (Приложение А – Акт выработки опытной партии олеогеля; Приложение Б – «Акт внедрения научно-исследовательских и технологических работ»). Было отработано 2 рецептуры спредов: «базовая», представляющая собой традиционную рецептуру растительно-жирового спреда жирностью 82,5% (таблица 20) и «опытную», в которой использовали 30% воскового олеогеля вместо заменителя молочного жира (таблица 20). Внешний вид полученных спредов представлен на рисунке 45.

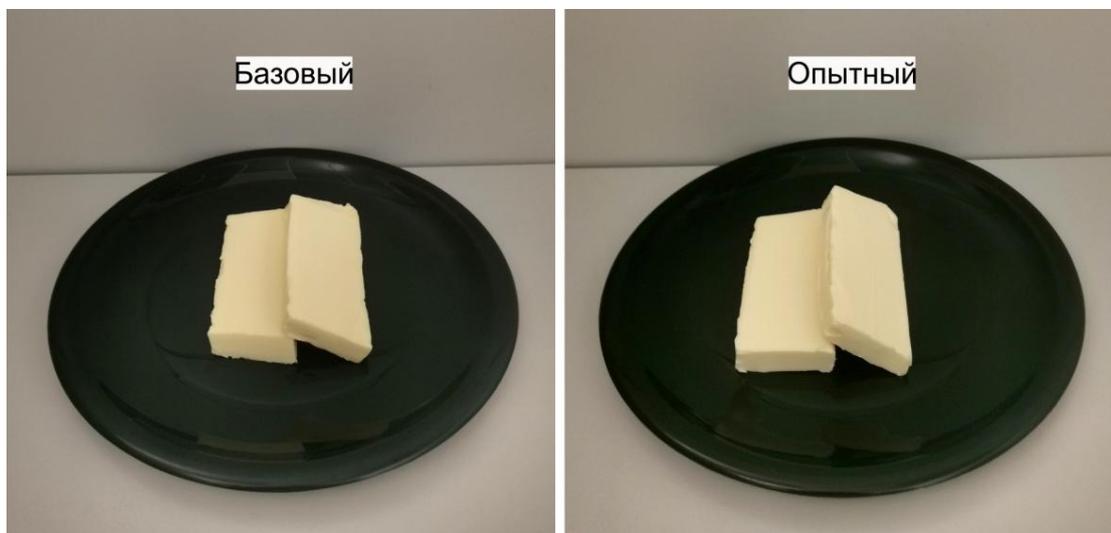


Рисунок 45. Внешний вид спредов, выработанных в условиях промышленного производства ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты»

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

На следующем этапе был проведен расчет экономической эффективности применения олеогелей. Учитывая простоту технологии приготовления олеогелей

и высокий ожидаемый спрос, предполагается, что они будут изготавливаться на опытно-промышленных производствах в различных субъектах РФ, по аналогии с используемым заменителем молочного жира «Эколакт». В таблице 25 представлен расчет потребности и стоимости сырья на 1 тонну продукции (3% гелеобразователя).

Таблица 25. Расчет потребности и стоимости сырья

<b>Наименование сырья</b>	<b>Норма расхода, кг/т</b>	<b>Цена за 1 кг сырья</b>	<b>Стоимость сырья на 1 т продукции, руб.</b>
Подсолнечное масло	970	90	87300
Пчелиный воск	30	800	24000
Итого	-	-	111300

Цены на сырье были взяты на основании оптовых закупочных цен. Исходя из расчетных данных, представленных в таблице 25, стоимость сырья для производства 1 тонны олеогеля равна 111300 рублей. Известно, что цена за 1 тонну используемого заменителя молочного жира «Эколакт» составляет 181800 рублей, что выше стоимости сырья, используемого для производства олеогеля. Несмотря на видимую эффективность, в структуре стоимости сырья олеогелей высокую долю расходов (19,4%) составляет гелеобразователь, поэтому дальнейший поиск путей снижения затрат на данную категорию будет способствовать уменьшению себестоимости олеогелей и, следовательно, продукции на их основе.

Учитывая меньшую себестоимость олеогеля относительно традиционного твердого жира и наличие отечественных производителей его сырья, предполагается, что во внедрении и дальнейшей реализации олеогелей в пищевом производстве будут заинтересованы производители пищевой продукции, стремящиеся к импортонезависимости. Социальная значимость и экономическая эффективность диссертационной работы, посвященной созданию олеогелей и их применению в качестве альтернативы твердым жирам, связана с приоритетным направлением Стратегии научно-технологического развития Российской

Федерации в области технологий здоровьесбережения путем снижения уровня социально-значимых заболеваний, таких, как сердечно-сосудистые, за счет сокращения в пищевом рационе критически значимых источников насыщенных и транс-изомерных кислот, что как следствие, будет способствовать сокращению бюджетных ассигнований на здравоохранение. Помимо этого, существует социальная значимость использования олеогелей, заключающаяся в расширении ассортимента жиросодержащих продуктов и возможности их обогащения жирорастворимыми витаминами D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub>, что будет способствовать профилактике их дефицита у населения.

В рамках диссертационного исследования была разработана техническая документация: технические условия ТУ 10.42.10-014-0897222-2023 и технологическая инструкция ТИ 10.42.10-014-0897222-2023 на производство воскового олеогеля (Приложение В), а также технические условия ТУ 10.42.10-015-0897222-2023 и технологическая инструкция ТИ 10.42.10-015-0897222-2023 на производство растительно-жирового спреда с использованием олеогеля (Приложение Г).

Таким образом, предполагается, что внедрение нового жирового продукта – олеогеля, позволит получить экономический и социальный эффекты. Дополнительно, использование олеогелей будет способствовать технологическому суверенитету предприятий в сырьевом сегменте.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате систематизации имеющихся научных данных показаны перспективы разработки пищевых олеогелей, структурированных различными восками, для применения в качестве альтернативы твердым жирам в составе пищевых продуктов с целью направленного снижения содержания насыщенных и транс-изомерных жирных кислот.
2. Показана возможность получения олеогелей с использованием пчелиного воска в качестве гелеобразователя жидких пищевых масел с различным жирнокислотным составом. Установлено влияние дисперсионной среды на функционально-технологические свойства образуемых олеогелей.
3. Разработана методика фракционирования пчелиного воска с помощью препаративной флеш-хроматографии с использованием гексана и ацетона в качестве элюентов. Получены отдельные фракции пчелиного воска (углеводороды, восковые эфиры, свободные жирные кислоты и спирты) и оценены их гелеобразующие свойства в подсолнечном масле.
4. Выявлены взаимосвязи между фракционным составом пчелиного воска и его гелеобразующими свойствами. Определено, что высокое содержание свободных жирных кислот и спиртов оказывает отрицательное влияние на технологические свойства олеогелей. Выявлена возможность регулирования температур фазовых переходов олеогелей путем изменения содержания углеводородов и восковых эфиров.
5. Показано, что использование комбинаций отдельных фракций пчелиного воска позволяет получать олеогели с улучшенными технологическими характеристиками и повышенной окислительной стабильностью относительно олеогелей на исходном пчелином воске.
6. Установлено, что витамины D<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> способны оказывать различное влияние на физические свойства олеогелей в зависимости от используемого гелеобразователя. Определено, что сохранность витамина D<sub>3</sub> в составе олеогелей выше более чем на 20% по сравнению с его сохранностью в неструктурированном

подсолнечном масле. Для олеогеля характерна большая сохранность витамина К<sub>2</sub> по сравнению с неструктурированным маслом.

7. Разработан жировой продукт в виде растительно-жирового спреда с частичной заменой твердого жира на олеогель, структурированный восковыми компонентами. Установлено, что рекомендованное содержание олеогеля, включающего 3% гелеобразователя, в качестве заменителя жира твердой консистенции составляет 30%, что позволяет заменить в готовом продукте часть твердых жиров и тем самым снизить содержание насыщенных жирных кислот на 21%, повысить содержание полиненасыщенных жирных кислот на 55%.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**ПВ** – пчелиный воск

**УВ** – углеводороды

**МЭ** – моноэфиры

**ВЭ** – восковые эфиры

**СЖК** – свободные жирные кислоты

**СЖС** – свободные жирные спирты

**ТАГ** – триацилглицерины

**ЛПНП** – липопротеины низкой плотности

**ЛПВП** – липопротеины высокой плотности

**ПЧ** – перекисное число

**АЧ** – анизидиновое число

**E232** – удельный коэффициент экстинкции

**ДСК** – дифференциально-сканирующая калориметрия

**ЛМ** – льняное масло

**ПМ** – подсолнечное масло

**ОМ** – оливковое масло

**РЖ** – рыбий жир

**КФ** – комбинация фракций

**ВК** – восковые компоненты

**ТУ** – технические условия

**ТИ** – технологическая инструкция

**НИЗ** – неинфекционные заболевания

**ЗМЖ** – заменитель молочного жира

**ВОЗ** – Всемирная организация здравоохранения

**РФ** – Российская Федерация

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Marangoni A.G., Garti N. Edible Oleogels: Structure and Health Implications // *Edible Oleogels: Structure and Health Implications*. – 2018. – P. 1-342.
2. Doan C.D. Chemical profiling of the major components in natural waxes to elucidate their role in liquid oil structuring // *Food Chem.* – 2017. – Vol. 214. P. 717–725.
3. Winkler-Moser J.K. Physical Properties of Beeswax, Sunflower Wax, and Candelilla Wax Mixtures and Oleogels // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2019. – Vol. 96, № 10. – P. 1125–1142.
4. Нечаев А.П. Ключевые тенденции в производстве масложировых продуктов // *Продукты и прибыль*. – 2011. – № 2. С. 6–9.
5. Нечаев А. П., Траубенберг С. Е., Кочеткова А. А. *Пищевая химия*. – 2006.
6. Тутельян В. А., Нечаев А. П., & Кочеткова А. А. Функциональные жировые продукты в структуре питания // *Масложировая промышленность*. – 2009. – Т. 6. – С. 6–9.
7. Himawan C., Starov V.M., Stapley A.G.F. Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2006. – Vol. 122, № 1–3. P. 3–33.
8. Зайцева Л. Роль различных жирных кислот в питании человека при производстве пищевых продуктов // *Пищевая промышленность*. – 2010. – Т. 10. С. 60–63.
9. De Souza R.J. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis of observational studies // *BMJ (Online)*. – 2015. – Vol. 351.
10. Чазова И., Ощепкова Е. Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями: проблемы и пути их решения на современном этапе // *Вестник*

Росздравнадзора. – 2015 – Т. 5. – С. 7–10.

11. World Health Organization. Countdown to 2023: WHO report on global trans fat elimination 2021. World Health Organization, – 2021.
12. Davidovich-Pinhas M. Oil structuring using polysaccharides // *Curr. Opin. Food.* – 2019. – Vol. 27. – P. 29–35.
13. Patel A.R., Dewettinck K. Comparative evaluation of structured oil systems: Shellac oleogel, HPMC oleogel, and HIPE gel // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* Wiley-VCH Verlag, – 2015. – Vol. 117, № 11. – P. 1772–1781.
14. Manzoor S. Oleogels: Promising alternatives to solid fats for food applications / Manzoor, S., Masoodi, F. A., Naqash, F., & Rashid, R. // *Food Hydrocolloids for Health.* – 2022. – Vol. 2.
15. Fasolin L.H. Thermodynamic, rheological and structural properties of edible oils structured with LMOGs: Influence of gelator and oil phase / Fasolin, L. H., Cerqueira, M. A., Pastrana, L. M., Vicente, A. A., & Cunha, R. L. // *Food Struct.* Elsevier. – 2018. Vol. 16. – P. 50–58.
16. Aliasl khiabani A. Preparation and characterization of carnauba wax/adipic acid oleogel: A new reinforced oleogel for application in cake and beef burger // *Food Chem.* – 2020. – Vol. – 333.
17. Puscas A. Oleogels in food: A review of current and potential applications / Pușcaș, A., Mureșan, V., Socaciu, C., & Muste, S. // *Foods.* – 2020. – Vol. 9, № 1.
18. Tavernier I. Sequential crystallization of high and low melting waxes to improve oil structuring in wax-based oleogels / Tavernier, I., Doan, C. D., Van de Walle, D., Danthine, S., Rimaux, T., & Dewettinck, K. // *RSC Adv.* – 2017. – Vol. 7, № 20. – P. 12113–12125.
19. Endlein E., Peleikis K. Natural Waxes—Properties, Compositions and Applications // *SÖFW-Journal.* – 2011. – Vol. 137, № 4.
20. Okuro P.K. Synergistic interactions between lecithin and fruit wax in oleogel

- formation / Okuro, P. K., Tavernier, I., Sintang, M. D. B., Skirtach, A. G., Vicente, A. A., Dewettinck, K., & Cunha, R. L. // *Food Funct.* – 2018. – Vol. 9, № 3. P. 1755–1767.
21. Mukkamala R., Weiss R.G. Physical gelation of organic fluids by anthraquinone-steroid-based molecules. Structural features influencing the properties of gels // *Langmuir*. American Chemical Society. – 1996. – Vol. 12, № 6. – P. 1474–1482.
  22. Bogdanov S. Quality and Standards of Pollen and Beeswax // *Apiacta*. – 2004. – Vol. 38, № August. P. 334–341.
  23. Kim H.J., Min D.B., Akoh C.C. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology* // CRC Press. CRC Press, Boca Raton. – 2008.
  24. Kanya T.C.S., Rao L.J., Sastry M.C.S. Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries // *Food Chem.* – 2007. – Vol. 101, № 4. – P. 1552–1557.
  25. Tulloch A.P. The composition of beeswax and other waxes secreted by insects // *Lipids*. Springer-Verlag. – 1970. – Vol. 5, № 2. – P. 247–258.
  26. Buchwald R. Interspecific variation in beeswax as a biological construction material / Buchwald, R., Breed, M. D., Greenberg, A. R., & Otis, G. // *J. Exp. Biol.* – 2006. – Vol. 209, № 20. – P. 3984–3989.
  27. Holloway P.J., Challen S.B. Thin layer chromatography in the study of natural waxes and their constituents // *J. Chromatogr. A*. – 1966. – Vol. 25, № C. – P. 336–346.
  28. Martins C.M.C., Mesquita S.M.M., Vaz W.L.C. Cuticular waxes of the Holm (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) and cork (*Q. suber* L.) oaks // *Phytochem. Anal.* – 1999. – Vol. 10, № 1. – P. 1–5.
  29. Kostanyan A.A., Voshkin A.A., Belova V. V. Analytical, Preparative, and Industrial-Scale Separation of Substances by Methods of Countercurrent Liquid-Liquid Chromatography // *Molecules*. – 2020. Vol. 25, № 24.

30. Chaudhari H. A Review on a flash chromatography // *Int. J. Pharm. Dev. Technol.* – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 80–84.
31. Svečnjak L. An approach for routine analytical detection of beeswax adulteration using ftir-atr spectroscopy / Svečnjak, L., Baranović, G., Vinceković, M., Prđun, S., Bubalo, D., & Gajger, I. T. // *J. Apic. Sci.* – 2015. – Vol. 59, № 2. – P. 37–49.
32. Gravelle A.J. Influence of solvent quality on the mechanical strength of ethylcellulose oleogels // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – Vol. 135. – P. 169–179.
33. Yilmaz E., Ögütcü M. Properties and stability of hazelnut oil organogels with beeswax and monoglyceride // *J. Am. Oil Chem. Soc. Wiley Online Library.* – 2014. – Vol. 91, № 6. P. 1007–1017.
34. ГОСТ Р. 51487-99. Масла растительные и жиры животные. Метод определения перекисного числа - М.: Изд-во стандартов. 1999.
35. ГОСТ И.С.О. 31756-2012 Жиры и масла животные и растительные. Определение анизидинового числа - М.: Стандартинформ. 2014.
36. Международный стандарт ISO. 3656:2011 Жиры и масла животные и растительные. Определение поглощения в ультрафиолетовом свете, выраженное в виде удельной экстинкции. – 2011.
37. Kindleysides S., Quek S.Y., Miller M.R. Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 133, № 4. – P. 1624–1631.
38. ГОСТ Р. 34815-2021 Продукты пищевые Ускоренный тест на окисление с использованием окислительного испытательного реактора - М.: Стандартинформ. 2021.
39. ГОСТ Е. 12821-2014 «Продукты пищевые. Определение содержания холекальциферола (витамина D 3) и эргокальциферола (витамина D 2) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // М.: Стандартинформ. 2014.

40. ГОСТ Е. 14148-2015 «Продукция пищевая. Определение витамина К1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» - М.: Стандартиформ. 2016.
41. Haighton A.J. The measurement of the hardness of margarine and fats with cone penetrometers // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1959. – Vol. 36, № 8. – P. 345–348.
42. Do V.H. Novel formulation of low-fat spread using rice starch modified by 4--glucanotransferase. – 2015.
43. Wijarnprecha K. Structure and rheology of oleogels made from rice bran wax and rice bran oil / Wijarnprecha, K., Aryusuk, K., Santiwattana, P., Sonwai, S., & Rousseau, D // Food Res. Int. – 2018. – Vol. 112. – P. 199–208.
44. ГОСТ Р. 34178-2017 Спреды и смеси топленые. Общие технические условия - М.: Стандартиформ. 2017.
45. Puşcaş A., Mureşan V. The Feasibility of Shellac Wax Emulsion Oleogels as Low-Fat Spreads Analyzed by Means of Multidimensional Statistical Analysis // Gels. – 2022. – Vol. 8, № 11.
46. Szymańska I., Żbikowska A., Onacik-Gür S. Candelilla wax-based oleogels versus palm oil: evaluation of physical properties of innovative and conventional lipids using optical techniques // J. Sci. Food Agric. John Wiley and Sons Ltd. – 2022. – Vol. 102, № 6. P. 2309–2320.
47. Соболев, Р. В., Фролова, Ю. В., & Саркисян, В. А. Пчелиный воск как структурообразователь пищевых олеогелей // II Школа молодых ученых "Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний". – 2019. – С. 103.
48. Соболев Р., Фролова Ю., Саркисян В. Изучение свойств олеогелей на основе подсолнечного масла и рыбьего жира // Церевитиновские чтения. – 2022. – С. 53.
49. Кочеткова А.А. Пищевые олеогели: свойства и перспективы использования / Кочеткова, А. А., Саркисян, В. А., Коденцова, В. М., Фролова, Ю. В., &

- Соболев, Р. В. // Пищевая промышленность. – 2019. – Т. 8. – С. 30–35.
50. Соболев Р., Саркисян В., Фролова Ю. Перспективы биотехнологических приемов для повышения потенциала пчелиного воска в качестве структурообразователя // Биотехнология: Состояние и перспективы развития. – 2020. – С. 294–295.
51. Frolova Y., Sobolev R., Kochetkova A. Influence of oil combinations on the structural properties of oleogels // E3S Web of Conferences. – 2021. – Vol. 285. – Art. number 05009.
52. Frolova Y. The Influence of Edible Oils' Composition on the Properties of Beeswax-Based Oleogels / Frolova, Y., Sarkisyan, V., Sobolev, R., Makarenko, M., Semin, M., & Kochetkova, A. // Gels. – 2022. – Vol. 8, № 1. – Art. number 48.
53. Фролова, Ю. В. Олеогели как перспективные пищевые ингредиенты липидной природы / Фролова, Ю. В., Кочеткова, А. А., Соболев, Р. В., Воробьева, В. М., & Коденцова В.М.// Вопросы питания. – 2021. – Т. 90, № 4. – С. 64–73.
54. Fayaz G., Calligaris S., Nicoli M.C. Comparative Study on the Ability of Different Oleogelators to Structure Sunflower Oil // Food Biophys. – 2020. – Vol. 15, № 1. – P. 42–49.
55. Franco D. Evaluation of linseed oil oleogels to partially replace pork backfat in fermented sausages / Franco, D., Martins, A. J., López-Pedrouso, M., Cerqueira, M. A., Purriños, L., Pastrana, L. M., & Lorenzo, J. M. // J. Sci. Food Agric. – 2020. – Vol. 100, № 1. – P. 218–224.
56. Papadaki A. Olive oil oleogel formulation using wax esters derived from soybean fatty acid distillate / Papadaki, A., Kopsahelis, N., Freire, D. M., Mandala, I., & Koutinas, A. A // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, № 1.
57. Zhang R. Effects of oleogels prepared with fish oil and beeswax on the gelation behaviors of protein recovered from Alaska Pollock // LWT. – 2021. – Vol. 137.
58. Doan C.D. Evaluating the oil-gelling properties of natural waxes in rice bran oil:

- Rheological, thermal, and microstructural study / Doan, C. D., Van de Walle, D., Dewettinck, K., & Patel, A. R. // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2015. – Vol. 92. – P. 801–811.
59. Fayaz G. Potential application of pomegranate seed oil oleogels based on monoglycerides, beeswax and propolis wax as partial substitutes of palm oil in functional chocolate spread / Fayaz, G., Goli, S. A. H., Kadivar, M., Valoppi, F., Barba, L., Calligaris, S., & Nicoli, M. C. // *LWT.* – 2017. – Vol. 86. – P. 523–529.
60. Calligaris S. Effect of Oil Type on Formation, Structure and Thermal Properties of  $\gamma$ -oryzanol and  $\beta$ -sitosterol-Based Organogels // *Food Biophys.* – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 69–75.
61. Xu Z. Evaluation of trans fatty acids, carbonyl compounds and bioactive minor components in commercial linseed oils / Xu, Z., Liu, S., Shen, M., Xie, J., & Yang, J. // *Food Chem.* – 2022. – Vol. 369.
62. Dell'agli M., Bosisio E. Minor polar compounds of olive oil: Composition, factors of variability and bioactivity // *Stud. Nat. Prod. Chem.* – 2002. – Vol. 27. – P. 697–734.
63. El-Din Bekhit A.A. Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities / Bekhit, A. E. D. A., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch, J., Teh, S., Ahmed, I. A. M., & Bekhit, A. A. // *Elsevier.* – 2018. – Vol. 13. – P. 129–152.
64. Toro-Vazquez J. Development of Trans-free Lipid Systems and their Use in Food Products // *Development of Trans-free Lipid Systems and their Use in Food Products.* – 2022.
65. Martins A.J. Beeswax organogels: Influence of gelator concentration and oil type in the gelation process // *Food Res. Int.* – 2016. – Vol. 84. – P. 170–179.
66. Blake A.I., Marangoni A.G. Plant wax crystals display platelet-like morphology // *Food Struct.* – 2015. – Vol. 3. – P. 30–34.
67. Palla C. Effects of cooling temperature profiles on the monoglycerides oleogel properties: A rheo-microscopy study / Palla, C., de Vicente, J., Carrin, M. E., &

- Ruiz, M. J. G. // *Food Res. Int.* – 2019. – Vol. 125.
68. Shi Y. Gelation behavior and crystal network of natural waxes and corresponding binary blends in high-oleic sunflower oil / Shi, Y., Liu, C., Zheng, Z., Chai, X., Han, W., & Liu, Y // *J. Food Sci.* – 2021. – Vol. 86, № 9. – P. 3987–4000.
69. Ögütçü M., Arifoğlu N., Yilmaz E. Storage stability of cod liver oil organogels formed with beeswax and carnauba wax // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 2015. – Vol. 50, № 2. – P. 404–412.
70. Callau M. Effect of the ratio between fatty alcohol and fatty acid on foaming properties of whipped oleogels / Callau, M., Sow-Kébé, K., Jenkins, N., & Fameau, A. L. // *Food Chem.* – 2020. – Vol. 333. – P. 127403.
71. Choi K.O. The thermal, rheological, and structural characterization of grapeseed oil oleogels structured with binary blends of oleogelator // *J. Food Sci.* – 2020. – Vol. 85, № 10 – P. 3432–3441.
72. Yao Y. The effect of cooling rate on the microstructure and macroscopic properties of rice bran wax oleogels / Yao, Y., Zhou, H., Liu, W., Li, C., & Wang, S. // *J. Oleo Sci.* – 2021. – Vol. 70, № 1. – P. 135–143.
73. Scharfe M. On the Effect of Minor Oil Components on  $\beta$ -Sitosterol/ $\gamma$ -oryzanol Oleogels / Scharfe, M., Ahmane, Y., Seilert, J., Keim, J., & Flöter, E. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2019. – Vol. 121, № 8.
74. Cameron D.G., Gudgin E.F., Mantsch H.H. Dependence of Acyl Chain Packing of Phospholipids on the Head Group and Acyl Chain Length // *Biochemistry.* – 1981. – Vol. 20, № 15. – P. 4496–4500.
75. Hondoh H., Ueno S. Polymorphism of edible fat crystals // *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials.* – 2016. – Vol. 62, № 2. – P. 398–399.
76. Pang M. Structure and thermal properties of beeswax-based oleogels with different types of vegetable oil // *Grasas y Aceites.* – 2020. – Vol. 71, № 4.
77. Jiménez-Colmenero F. Konjac gel fat analogue for use in meat products:

- Comparison with pork fats // *Food Hydrocoll.* – 2012. – Vol. 26, № 1. – P. 63–72.
78. Hwang H.S. Organogel formation of soybean oil with waxes / Hwang, H. S., Kim, S., Singh, M., Winkler-Moser, J. K., & Liu, S. X // *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 89, № 4. – P. 639–647.
79. Juárez M.D. Degradation in soybean oil, sunflower oil and partially hydrogenated fats after food frying, monitored by conventional and unconventional methods / Juárez, M. D., Osawa, C. C., Acuña, M. E., Sarmán, N., & Gonçalves, L. A. G // *Food Control.* – 2011. – Vol. 22, № 12. – P. 1920–1927.
80. Sarkisyan V. A Study of the Quantitative Relationship between Yield Strength and Crystal Size Distribution of Beeswax Oleogels / Sarkisyan, V., Sobolev, R., Frolova, Y., Vorobiova, I., & Kochetkova, A. // *Gels.* – 2022. – Vol. 8, № 1. – P. 39.
81. Sobolev R. Fractionation of beeswax for edible oleogel applications. / Sobolev, R., Frolova, Y., Sarkisyan, V., & Kochetkova, A. // *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society.* – 2021. – Vol. 98. – P. 79.
82. Sarkisyan V. Study of microstructure entropy to optimize wax-based oleogel production technology / Sarkisyan, V., Kochetkova, A., Sobolev, R., & Frolova, Y. // *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society.* – 2022. – Vol. 99. – P. 62–63.
83. Sarkisyan V. Beeswax Fractions Used as Potential Oil Gelling Agents / Sarkisyan, V., Sobolev, R., Frolova, Y., Malinkin, A., Makarenko, M., & Kochetkova, A. // *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2021. – Vol. 98, № 3. – P. 281–296.
84. Stevens W.C., Hill D.C. General methods for flash chromatography using disposable columns // *Mol. Divers.* – 2009. – Vol. 13, № 2. – P. 247–252.
85. Bankova V. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research // *J. Apic. Res.* – 2016. – Vol. 58, № 2. – P. 1–49.
86. Khoury S. Quantification of lipids: Model, reality, and compromise / Khoury, S., Canlet, C., Lacroix, M. Z., Berdeaux, O., Jouhet, J., & Bertrand-Michel, J. // *Biomolecules.* – 2018. – Vol. 8, № 4.

87. Haliński L.P. Chromatographic fractionation and analysis of the main components of eggplant (*Solanum melongena* L.) leaf cuticular waxes // *Acta Chromatogr.* – 2009. – Vol. 21, № 1. – P. 127–137.
88. Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts. – 2004.
89. Svečnjak L. Standard methods for *Apis mellifera* beeswax research / Svečnjak, L., Chesson, L. A., Gallina, A., Maia, M., Martinello, M., Mutinelli, F., ... & Waters, T. A. // *Journal of Apicultural Research.* – 2019. – Vol. 58, № 2. – P. 1–108.
90. Wright A.J. Solvent effects on the crystallization behavior of milk fat fractions / Wright, A. J., McGauley, S. E., Narine, S. S., Willis, W. M., Lencki, R. W., & Marangoni, A. G. // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – Vol. 48, № 4. – P. 1033–1040.
91. da Silva T.L.T., Arellano D.B., Martini S. Use of High-Intensity Ultrasound to Change the Physical Properties of Oleogels and Emulsion Gels // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2019. – Vol. 96, № 6. – P. 681–691.
92. Tulloch A.P. Beeswax—Composition and Analysis // *Bee World.* – 1980. – Vol. 61, № 2. – P. 47–62.
93. Buchwald R. The role of fatty acids in the mechanical properties of beeswax // *Apidologie.* – 2009. – Vol. 40, № 5. – P. 585–594.
94. Craven R.J., Lencki R.W. Binary phase behavior of diacid 1,3-diacylglycerols // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 88, № 8. – P. 1125–1134.
95. Timms R.E. Phase behaviour of fats and their mixtures // *Progress in Lipid Research.* – 1984. – Vol. 23, № 1. – P. 1–38.
96. Wei D., Han S., Shen X. Solid–liquid phase equilibria of (n-octadecane with myristic, and palmitic acid) binary mixtures used as phase change materials (PCMs) // *J. Chem. Thermodyn.* – 2016. – Vol. 101. – P. 7–11.
97. Jana S., Martini S. Phase Behavior of Binary Blends of Four Different Waxes // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2016. – Vol. 93, № 4. – P. 543–554.

98. Jana S., Martini S. Physical characterization of crystalline networks formed by binary blends of waxes in soybean oil // *Food Res. Int.* – 2016. – Vol. 89. – P. 245–253.
99. Gandolfo F.G., Bot A., Flöter E. Structuring of Edible Oils by Long-Chain FA, Fatty Alcohols, and Their Mixtures // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc. American Oil Chemists' Society.* – 2004. – Vol. 81, № 1. – P. 1–6.
100. Саркисян В.А. Прогнозирование температур плавления восковых гелеобразователей в зависимости от их компонентного состава / Саркисян, В. А., Фролова, Ю. В., Соболев, Р. В., & Кочеткова, А. А // *Вопросы питания.* – 2022. – Т. 91, № 2. – С. 99–104.
101. Sarkisyan V. On the Role of Beeswax Components in the Regulation of Sunflower Oil Oleogel Properties / Sarkisyan, V., Frolova, Y., Sobolev, R., & Kochetkova, A. // *Food Biophys.* – 2023. – Vol. 18, № 2. – P. 262–272.
102. Фролова Ю.В., Саркисян В.А. Соболев Р.В. Потенциал пищевых олеогелей, структурированных углеводородами пчелиного воска // *Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний.* – 2022. – С. 102–104.
103. Sobolev R. Effect of beeswax and combinations of its fractions on the oxidative stability of oleogels / Sobolev, R., Frolova, Y., Sarkisyan, V., Makarenko, M., & Kochetkova, A. // *Food Biosci.* – 2022. – Vol. 48. – Art. number 101744.
104. Gómez-Estaca J. Characterization of ethyl cellulose and beeswax oleogels and their suitability as fat replacers in healthier lipid pâtés development // *Food Hydrocoll.* – 2019. – Vol. 87. – P. 960–969.
105. Brykczynski H., Hetzer B., Flöter E. An Attempt to Relate Oleogel Properties to Wax Ester Chemical Structures // *Gels.* – 2022. – Vol. 8, № 9.
106. Marangoni A.G. Fat crystal networks // *Fat Crystal Networks.* – 2004. – P. 1-828
107. Bennema P. Morphology of orthorhombic long chain normal alkanes: theory and observations / Bennema, P., Liu, X. Y., Lewtas, K., Tack, R. D., Rijpkema, J. J.

- M., & Roberts, K. J. // *J. Cryst. Growth.* – 1992. – Vol. 121, № 4. – P. 679–696.
108. Brykczynski H., Wettlaufer T., Flöter E. Revisiting pure component wax esters as basis of wax-based oleogels // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2022. – Vol. 99, № 11. – P. 925–941.
109. Morales-Rueda J.A. Rheological properties of candelilla wax and dotriacontane organogels measured with a true-gap system / Morales-Rueda, J. A., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M. A., & Toro-Vazquez, J. F. // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 86, № 8. – P. 765–772.
110. Blach C. Revisiting the crystallization behavior of stearyl alcohol : stearic acid (SO : SA) mixtures in edible oil // *RSC Adv.* – 2016. – Vol. 6, № 84. – P. 81151–81163.
111. Martins A.J. Edible oleogels: An opportunity for fat replacement in foods / Martins, A. J., Vicente, A. A., Cunha, R. L., & Cerqueira, M. A. // *Food and Function.* – 2018. – Vol. 9, № 2. – P. 758–773.
112. Bayés-García L. In situ observation of transformation pathways of polymorphic forms of 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol (POP) examined with synchrotron radiation X-ray diffraction and DSC / Bayés-García, L., Calvet, T., Cuevas-Diarte, M., Ueno, S., & Sato, K. // *CrystEngComm.* – 2013. – Vol. 15, № 2. – P. 303–314.
113. Ghazani S.M., Dobson S., Marangoni A.G. Hardness, plasticity, and oil binding capacity of binary mixtures of natural waxes in oliveoil: Binary mixtures of natural waxes in olive oil // *Curr. Res. Food Sci.* – 2022. – Vol. 5. – P. 998–1008.
114. Rosen-Kligvasser J., Davidovich-Pinhas M. The role of hydrogen bonds in TAG derivative-based oleogel structure and properties // *Food Chem.* – 2021. – Vol. 334.
115. Yilmaz E., Keskin Uslu E., Öz C. Oleogels of Some Plant Waxes: Characterization and Comparison with Sunflower Wax Oleogel // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2021. – Vol. 98, № 6. – P. 643–655.
116. Doan C.D. Internal and external factors affecting the crystallization, gelation and

- applicability of wax-based oleogels in food industry // *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. – 2018. – Vol. 45. – P. 42–52.
117. da Silva T.L.T., Danthine S. Effect of high-intensity ultrasound on the oleogelation and physical properties of high melting point monoglycerides and triglycerides oleogels // *J. Food Sci.* – 2021. – Vol. 86. № 2. – P. 343–356.
118. Frolova Y. Ultrasonic Treatment of Food Colloidal Systems Containing Oleogels: A Review / Frolova, Y., Sarkisyan, V., Sobolev, R., & Kochetkova, A. // *Gels*. – 2022. – Vol. 8. Art. number 12.
119. Frolova Y. V. Approaches to study the oxidative stability of oleogels / Frolova, Y. V., Sobolev, R. V., Sarkisyan, V. A., & Kochetkova, A. A. // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2021. – Vol. 677, № 3.
120. Фролова Ю., Соболев Р., Саркисян В. Влияние технологического процесса получения олеогелей на окислительные показатели масложировой продукции // *Инновационные технологии обработки и хранения сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов*. – 2020. – С. 387–394.
121. Саркисян В., Фролова Ю., Соболев Р. Риски использования олеогелей на основе моноглицеридов жирных кислот в технологии пищевых продуктов // *Церевитиновские чтения*. – 2020. – С. 86–87.
122. Sobolev R. Study of the oxidative stability of oleogels structured with beeswax fractions. / Sobolev, R., Frolova, Y., Sarkisyan, V., & Kochetkova, A. // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2022. – Vol. 99. – P. 124–125.
123. Kupiec M. Rapeseed oil in new application: Assessment of structure of oleogels based on their physicochemical properties and microscopic observations / Kupiec, M., Zbikowska, A., Marciniak-Lukasiak, K., & Kowalska, M. // *Agriculture*. – 2020. – Vol. 10, № 6. – P. 1–11.
124. Alongi M. Oleogelation of extra virgin olive oil by different oleogelators affects the physical properties and the stability of bioactive compounds // *Food Chem.* – 2022. – Vol. 368. – Art. number 130779.

125. Davidovich-Pinhas M., Barbut S., Marangoni A.G. The gelation of oil using ethyl cellulose // *Carbohydr. Polym.* – 2015. – Vol. 117. – P. 869–878.
126. Velasco J., Andersen M.L., Skibsted L.H. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry // *Food Chem.* – 2004. – Vol. 85, № 4. – P. 623–632.
127. Kurek-Górecka A. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis // *Molecules.* – 2014. – Vol. 19, № 1. – P. 78–101.
128. Yılmaz E., Uslu E.K., Toksöz B. Structure, rheological and sensory properties of some animal wax based oleogels // *J. Oleo Sci.* – 2020. – Vol. 69, № 10. – P. 1317–1329.
129. Liu L. Evaluation of oil-gelling properties and crystallization behavior of sorghum wax in fish oil / Liu, L., Ramirez, I. S. A., Yang, J., & Ciftci, O. N // *Food Chem.* – 2020. – Vol. 309.
130. Park C., Bemer H.L., Maleky F. Oxidative Stability of Rice Bran Wax Oleogels and an Oleogel Cream Cheese Product // *JAOCOS, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2018. – Vol. 95, № 10. – P. 1267–1275.
131. Yi B.R. Physicochemical properties and oxidative stability of oleogels made of carnauba wax with canola oil or beeswax with grapeseed oil / Yi, B., Kim, M. J., Lee, S. Y., & Lee, J. // *Food Sci. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 26, № 1. – P. 79–87.
132. Hwang H.S. Oxidation of Fish Oil Oleogels Formed by Natural Waxes in Comparison With Bulk Oil / Hwang, H. S., Phaner, M., Winkler-Moser, J. K., & Liu, S. X. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 120, № 5.
133. Wang N. Crude Wax Extracted from Rice Bran Oil Improves Oleogel Properties and Oxidative Stability // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2021. – Vol. 123, № 6.
134. Guo Y. Synthesis, physicochemical properties, and health aspects of structured lipids: A review // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* – 2020. – Vol. 19, № 2. – P. 759–800.

135. Moghtadaei M., Soltanizadeh N., Goli S.A.H. Production of sesame oil oleogels based on beeswax and application as partial substitutes of animal fat in beef burger // *Food Res. Int.* – 2018. – Vol. 108. – P. 368–377.
136. Kouzounis D., Lazaridou A., Katsanidis E. Partial replacement of animal fat by oleogels structured with monoglycerides and phytosterols in frankfurter sausages // *Meat Sci.* – 2017. – Vol. 130. – P. 38–46.
137. Щербин В. Биохимическое обоснование влияния жирнокислотного состава смесей растительных масел на их биологическую ценность и окислительную стойкость при хранении. – 2005.
138. Choe E., Min D.B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* – 2006. – Vol. 5, № 4. – P. 169–186.
139. Venkateshwarlu G. Chemical and Olfactometric Characterization of Volatile Flavor Compounds in a Fish Oil Enriched Milk Emulsion // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – Vol. 52, № 2. – P. 311–317.
140. Ye L. Flavors' Decreasing Contribution to p-Anisidine Value over Shelf Life May Invalidate the Current Recommended Protocol for Flavored Fish Oils / Ye, L., Harris, E., Budge, S. M., & Sullivan Ritter, J. // *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2020. – Vol. 97, № 12. – P. 1335–1341.
141. Shahidi F., Wanasundara U.N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils // *Food lipids Chem. Nutr. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 387–403.
142. Lim J., Hwang H.S., Lee S. Oil-structuring characterization of natural waxes in canola oil oleogels: rheological, thermal, and oxidative properties // *Appl. Biol. Chem.* – 2017. – Vol. 60, № 1. – P. 17–22.
143. Winkler–Moser J.K., Hwang H.S., Kerr B.J. Changes in markers of lipid oxidation and thermal treatment in feed-grade fats and oils // *J. Sci. Food Agric.* – 2020. – Vol. 100, № 8. – P. 3328–3340.
144. Starowicz M. Characterizing the volatile and sensory profiles, and sugar content

- of beeswax, beebread, bee pollen, and honey // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 11.
145. Pontes M., Marques J.C., Câmara J.S. Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry // *Talanta*. – 2007. – Vol. 74, № 1. – P. 91–103.
146. Tsao C.H. Application of OXITEST for Prediction of Shelf-Lives of Selected Cold-Pressed Oils / Tsao, C. H., Chang, C. W., Ho, Y. C., Chuang, Y. K., & Lee, W. J. // *Front. Nutr.* – 2021. – Vol. 8.
147. Paradiso V.M. Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil // *Food Res. Int.* – 2010. – Vol. 43, № 5. – P. 1389–1394.
148. Yang S. Functional Characteristics of Oleogel Prepared from Sunflower Oil with  $\beta$ -Sitosterol and Stearic Acid // *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2017. – Vol. 94, № 9. – P. 1153–1164.
149. Chen B., McClements D.J., Decker E.A. Minor components in food oils: A critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2011. – Vol. 51, № 10. – P. 901–916.
150. Pu J., Sathivel S. Kinetics of lipid oxidation and degradation of flaxseed oil containing crawfish (*Procambarus clarkii*) astaxanthin // *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 88, № 5. – P. 595–601.
151. Xie H.K. et al. Effects of natural phenolics on shelf life and lipid stability of freeze-dried scallop adductor muscle // *Food Chem.* – 2019. – Vol. 295. – P. 423–431.
152. Yanishlieva-Maslarova N. Inhibiting oxidation // *Antioxidants food Pract. Appl.* – 2001. – P. 22–70.
153. Фролова Ю., Соболев Р. Перспективы использования олеогелей для оптимизации витаминного статуса организма // *Пищевые технологии*

- будущего: инновационные идеи, научный поиск, креативные решения. – 2021. – С. 240–243.
154. Фролова Ю., Соболев Р., Кочеткова А. Пищевые ингредиенты липидной природы с витаминами Д<sub>3</sub> и К<sub>2</sub>, структурированные моноэфирами пчелиного воска // Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровьесберегающих технологий. – 2022. – С. 456–458.
155. Фролова Ю.В., Соболев Р.В., Саркисян В.А. Прикладные аспекты обогащения олеогелей витаминами Д<sub>3</sub> И К<sub>2</sub> // Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. – 2022. – № 1. С. 341–346.
156. Козлов А. Вершубская Г. Сывороточный 25-гидроксивитамин D в различных группах населения России, Украины и Беларуси (систематический обзор с элементами мета-анализа) // Физиология человека. – 2017. – Т. 43, № 6. – С. 135–146.
157. Коденцова В. Витаминная обеспеченность взрослого населения Российской Федерации: 1987–2017 гг. / Коденцова, В. М., Вржесинская, О. А., Никитюк, Д. Б., & Тутельян, В. А. (2018) // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № 4. – С. 62–68.
158. Петрушкина А.А., Пигарова Е.А. Эпидемиология дефицита витамина D в Российской Федерации // Остеопороз и остеопатии. – 2018. – Т. 21, № 3. – С. 15–20.
159. Драпкина О. Место витамина D в профилактике преждевременного старения и развитии заболеваний, ассоциированных с возрастом / Драпкина, О. М., Шепель, Р. Н., Фомин, В. В., & Свистунов, А. А. // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 90, № 1. – С. 69–75.
160. Подзолков В., Покровская А. Дефицит витамина D и сердечно-сосудистая патология // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 90, № 9. – С. 144–150.

161. Sondarwa K. Vitamin D and Cardiovascular Disease // Contemporary Endocrinology. – 2018. – P. 151–164.
162. Ethgen O. Cost-effectiveness of personalized supplementation with vitamin D-rich dairy products in the prevention of osteoporotic fractures // Osteoporos. – 2016. – Vol. 27, № 1. – P. 301–308.
163. Chaturvedi S., Chaudhary R., Tiwari S. Contribution of crop biofortification in mitigating vitamin deficiency globally // Genome Engineering for Crop Improvement. – 2021. – P. 112–130.
164. Blake A.I., Marangoni A.G. The Effect of Shear on the Microstructure and Oil Binding Capacity of Wax Crystal Networks // Food Biophys. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. 403–415.
165. Sobolev R. Waxy Oleogels for Partial Substitution of Solid Fat in Margarines / Sobolev, R., Frolova, Y., Sarkisyan, V., & Kochetkova, A. // Gels. – 2023. – Vol. 9, № 9. Art. number 683.
166. Frolova Y. V., Sobolev R. V., Kochetkova A.A. Comparative analysis of the properties of cookies containing oleogel based on beeswax and its fractions // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – Vol. 941, № 1. – Art. number 012033.
167. Фролова Ю.В., Соболев Р.В Кочеткова А.А. Исследование печенья с модифицированным жировым компонентом // Пищевая промышленность. – 2021. – Т. 4. – С. 8–11.
168. Фролова Ю., Соболев Р. Олеогели как перспективное сырье для кондитерских и хлебобулочных изделий // Пищевые технологии будущего: инновационные идеи, научный поиск, креативные решения. – 2020. – С. 74–78.
169. Фролова Ю. Практика применения олеогелей в технологии колбасных изделий / Фролова, Ю. В., Соболев, Р. В., & Саркисян, В. А. // Мясные технологии. – 2020. – Т. 8. – С. 44–47.

170. Соболев Р.В., Фролова Ю.В., Саркисян В.А. Изучение возможности использования олеогеля в составе растительно-жировых спредов. – 2023. – С. 236-239.
171. Фролова Ю.В. Формирование органолептического профиля сахарного печенья с модифицированным жировым компонентом / Фролова, Ю. В., Соболев, Р. В., Саркисян, В. А., & Кочеткова, А. А. // Вопросы питания. – 2022. – Т. 91, № 2 (540). – С. 93–98.
172. Ghorghi Z. B. Fabrication of novel hybrid gel based on beeswax oleogel: Application in the compound chocolate formulation / Ghorghi, Z. B., Yeganehzad, S., Hesarinejad, M. A., Faezian, A., Kutsenkova, V., Gao, Z., Nishinari K. & Nepovinnikh, N. // Food Hydrocolloids. – 2023. – Т. 140. – Art. number 108599.
173. Gao Y. Beeswax: A potential self-emulsifying agent for the construction of thermal-sensitive food W/O emulsion / Gao, Y., Lei, Y., Wu, Y., Liang, H., Li, J., Pei, Y., & Liu, S. // Food Chem. – 2021. – Vol. 349.
174. Hwang H.S., Winkler-Moser J.K. Properties of margarines prepared from soybean oil oleogels with mixtures of candelilla wax and beeswax // J. Food Sci. – 2020. – Vol. 85, № 10. – P. 3293–3302.
175. JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of Certain Food Additives; Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva.
176. Chai X. Crystallization and Structural Properties of Oleogel-Based Margarine / Chai, X., Zhang, Y., Shi, Y., & Liu, Y. // Molecules. – 2022. – Vol. 27, № 24.
177. Sato K. Crystallization behaviour of fats and lipids - A review // Chem. Eng. Sci. – 2001. – Vol. 56, № 7. – P. 2255–2265.
178. Dubey V.K. Mechanical Characteristics of Paraffin Wax, Beeswax and HTPB as Rocket Propellant – A Comparative Study / Dubey, V. K., Mahottamananda, S. N., Khaleel, A. A., Kadiresh, P. N., & Thirumurugan, M. // Lecture Notes in Mechanical Engineering. – 2021. – P. 243–252.

**ПРИЛОЖЕНИЯ**

<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А</b>	Акт выработки опытной партии олеогеля
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б</b>	Акт внедрения научно-исследовательских и технологических работ
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ В</b>	Технические условия и технологическая инструкция по производству воскового олеогеля
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Г</b>	Технические условия и технологическая инструкция на производство спреда растительно-жирового с использованием олеогеля
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Д</b>	Дипломы и сертификаты

## Приложение А (обязательное)

Согласовано



ВРИО заместителя директора  
по научной работе ФГБУН  
«ФИЦ питания и биотехнологии», д.б.н.  
 Н.Р. Ефимочкина  
«» 2023г.

### АКТ

#### выработки опытной партии олеогеля

Настоящий акт составлен в том, что в июле 2023 года в условиях лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов была выработана опытная партия олеогеля (8 кг) с использованием подсолнечного масла в качестве дисперсионной среды и пчелиного воска (концентрация 3%) в качестве дисперсной фазы (структурообразователя).

Выработанная опытная партия предназначена для частичной замены традиционной жировой основы, заменителя молочного жира (содержание насыщенных жирных кислот более 40%) в составе растительно-жирового спреда. Для выработки опытной партии олеогеля использовали следующее сырье:

- масло подсолнечное рафинированное дезодорированное (ЭФКО, Россия), ГОСТ 1129-2013 Масло подсолнечное. Технические условия;
- воск пчелиный (производитель «Дом воска», Россия), ГОСТ 21179-2000 «Воск пчелиный. Технические условия».

Выработку опытной партии олеогеля осуществляли на универсальном пилотном оборудовании для получения жировых продуктов IMA Stephan 5 (Германия).

Стандартный технологический процесс состоит из следующих этапов:

1. Взвешивание компонентов с применением аналитических весов.
2. Загрузка компонентов в емкость смесителя установки.
3. Нагрев дисперсионной среды (подсолнечного масла) до 80 °С в емкости смесителя установки IMA Stephan 5.
4. Расплавление дисперсной фазы (пчелиного воска) в отдельной емкости при 90 °С (в среде подсолнечного масла, взятого в количестве 10% от общей рецептуры) с постоянным перемешиванием со скоростью 300 об/мин.
5. Внесение порции масла с расплавленным воском, полученной по пункту 4 в емкость смесителя пилотного оборудования IMA Stephan 5 (с нагретым, согласно пункту 3, подсолнечным маслом) и дальнейшее смешение компонентов при

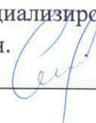
## Продолжение приложения А

непрерывном перемешивании в течение 10 минут и температуре водяной рубашки 80 °С.

6. Постепенное охлаждение полученного продукта при перемешивании до момента нуклеации кристаллов пчелиного воска.
7. Выгрузка и фасовка полученного продукта в пищевой контейнер.
8. Кристаллизация продукта в течение суток в холодильной камере при температуре 20 °С для формирования структуры.

### Выработку провели:

Инженер-исследователь лаборатории  
пищевых биотехнологий и  
специализированных продуктов  
 /P.V. Соболев/

Ст. научный сотрудник лаборатории  
пищевых биотехнологий и  
специализированных продуктов,  
к.б.н.  
 /В.А. Саркисян/

### Состав комиссии:

Ст. научный сотрудник лаборатории  
пищевых биотехнологий и  
специализированных продуктов,  
к.т.н.  
 /В.М. Воробьева/

Заведующий лабораторией  
химии пищевых продуктов,  
д.б.н.  
 /В.В. Бессонов/

Заведующий лабораторией  
пищевых биотехнологий и  
специализированных продуктов,  
чл.-корр. РАН, д.т.н., профессор  
 /А.А. Кочеткова/

## Приложение Б (обязательное)

Согласовано



ВРИО заместителя директора по научной работе ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», д.б.н.

Ефимочкина Н.Р.

«02» августа 2023 г.

Утверждаю

Представитель ООО «КРЦ «ЭФКО-Каскад»



Харланов О.И.

«02» августа 2023 г.

### Акт внедрения результатов научно-исследовательских и технологических работ

Настоящим актом подтверждаем, что 01 августа 2023 года в производственных условиях ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты» (РФ, 309850, Белгородская область, г. Алексеевка, ул. Фрунзе, д. 4) Соболевым Р.В. была осуществлена выработка опытной партии растительно - жирового спреда (жирность 82.5%) с использованием нового жирового компонента - олеогеля. Экспериментальные исследования выполнены на базе ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии».

Настоящим актом подтверждается факт внедрения результатов НИР, выполненных в рамках гранта РФФИ №19-16-00113.

Результатом внедрения является опытная партия (15 кг) растительно-жирового спреда со сниженным содержанием насыщенных жирных кислот и повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Продукт получен на существующей аппаратурно-технологической линии, с использованием рецептуры, разработанной в ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» при непосредственном участии Соболева Р.В.

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

**От ФГБУН  
«ФИЦ питания и биотехнологии»**

Заведующий лабораторией пищевых биотехнологий и специализированных продуктов  
Чл.- корр. РАН, д.т.н., профессор

Кочеткова А.А.

«02» августа 2023 г.

**От  
ООО «КРЦ «ЭФКО-Каскад»**

Представитель



Харланов О.И.

2023 г.

Исполнитель:

Инженер-исследователь

Соболев Р.В.

«02» августа 2023 г.

## Приложение В (обязательное)

ПРОЕКТ

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ  
(ФГБУН «ФИЦ ПИТАНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ»)

ОКПД 2: 10.42.10.140

ОКС 67.200.10



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ФГБУН «ФИЦ Питания и биотехнологии»

академик РАН, д.м.н., проф.

Д. Селев / Д.Б. Никитюк  
«07» июня 2023 г

**Восковый олеогель**

**Технические условия**

ТУ 10.42.10-014-01897222-2023

(Вводятся впервые)

Дата введения в действие \_\_\_\_\_

РАЗРАБОТАНО

ФГБУН «ФИЦ Питания и биотехнологии»  
Зав. лабораторией пищевых биотехнологий  
и специализированных продуктов,  
чл.-корр. РАН, д.т.н., профессор

А.А. Кочеткова  
«01» июля 2023 г

Ст. научный сотрудник, к.б.н.

В.А. Саркисян  
«01» июня 2023 г

Инженер-исследователь

Р.В. Соболев  
«01» июня 2023 г

Москва  
2023

**Продолжение приложения В**

**ПРОЕКТ**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И  
БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ  
(ФГБУН «ФИЦ ПИТАНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ»)

УТВЕРЖДАЮ



Директор ФГБУН  
«ФИЦ питания и биотехнологии»  
академик РАН, д.м.н., профессор  
Д.С.М. Д.Б. Никитюк  
Р.В.С. 2023 г.

**Технологическая инструкция  
по производству воскового олеогеля  
ТИ 10.42.10-014-01897222-2023  
(Вводятся впервые)**

Дата введения в действие \_\_\_\_\_

РАЗРАБОТАНО

Зав. лабораторией  
пищевых биотехнологий и  
специализированных продуктов,  
чл.-корр. РАН, д.т.н., проф.

А.А. Кочеткова  
Инженер-исследователь лаборатории  
пищевых биотехнологий и  
специализированных продуктов

Р.В. Соболев  
Р.В. Соболев

Москва, 2023

## Приложение Г (обязательное)

**ПРОЕКТ**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ  
(ФГБУН «ФИЦ ПИТАНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ»)

ОКПД 2: 10.42.10.122

ОКС 67.200.10



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ФГБУН «ФИЦ Питания и биотехнологии»

академик РАН, д.м.н., проф.

Д.Б. Никитюк / Д.Б. Никитюк

« 01 » июня 2023 г

### Спред растительно-жировой с использованием олеогеля

#### Технические условия

ТУ 10.42.10-015-01897222-2023

(Вводятся впервые)

Дата введения в действие \_\_\_\_\_

#### РАЗРАБОТАНО

ФГБУН «ФИЦ Питания и биотехнологии»  
Зав. лабораторией пищевых биотехнологий  
и специализированных продуктов,  
чл.-корр. РАН, д.т.н., профессор

А.А. Кочеткова  
« 01 » июня 2023 г

Ст. научный сотрудник, к.б.н.

В.А. Саркисян  
« 01 » июня 2023 г

Инженер-исследователь

Р.В. Соболев  
« 01 » июня 2023 г

Москва  
2023

## Продолжение приложения Г

**ПРОЕКТ**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
 ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И  
 БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ  
 (ФГБУН «ФИЦ ПИТАНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ»)

УТВЕРЖДАЮ



Директор ФГБУН  
 «ФИЦ питания и биотехнологии»  
 академик РАН, д.м.н., профессор  
Д. Б. Никитюк 2023 г.  
 « 01 » июня

**Технологическая инструкция  
 по производству растительно-жирового спреда  
 с использованием олеогеля  
 ТИ 10.42.10-015-0897222-2023  
 (Вводятся впервые)**

Дата введения в действие \_\_\_\_\_

РАЗРАБОТАНО

ФГБУН «ФИЦ Питания и биотехнологии»  
 Зав. лабораторией пищевых биотехнологий  
 и специализированных продуктов,  
 чл.-корр. РАН, д.т.н., проф.  
А.А. Кочеткова  
 « 01 » июня 2023 г.

Ст. научный сотрудник, к.б.н.  
В.А. Саркисян  
 « 01 » июня 2023 г.

Инженер-исследователь  
Р.В. Соболев  
 « 01 » июня 2023 г.

Москва, 2023

## Приложение Д (справочное)



The AOCS logo is located in the top left corner of the certificate. It consists of the letters "AOCS" in a white, sans-serif font, followed by a small white icon of a stylized plant or flower.

# Certificate of Presentation

Presented to

***Roman Sobolev, PhD student***

In recognition for serving as a Presenting Author at the

**2021 AOCS Annual Meeting & Expo**

May 3-14, 2021

Fractionation of beeswax for edible oleogel applications

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "PDH", is placed above a horizontal line.

Patrick Donnelly, PhD  
Chief Executive Officer, AOCS





SCIENCE  
OF THE  
FUTURE

НОВОСИБИРСК  
23-26 АВГУСТА  
2022



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ  
И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# СЕРТИФИКАТ

ПОДТВЕРЖДАЕТ УЧАСТИЕ

**Соболева Романа Владимировича**

VII ВСЕРОССИЙСКИЙ МОЛОДЁЖНЫЙ ФОРУМ

НАУКА БУДУЩЕГО - НАУКА МОЛОДЫХ

ДМИТРИЙ ИВАНОВ  
ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА



SCIENCE  
OF THE  
FUTURE

РОССИЯ  
17-20 НОЯБРЯ  
2021



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ  
И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# СЕРТИФИКАТ

ПОДТВЕРЖДАЕТ УЧАСТИЕ

**Соболев Роман Владимирович**

В IV МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
«НАУКА БУДУЩЕГО»

В VI ВСЕРОССИЙСКОМ МОЛОДЁЖНОМ НАУЧНОМ ФОРУМЕ  
«НАУКА БУДУЩЕГО – НАУКА МОЛОДЫХ»

ДМИТРИЙ ИВАНОВ  
ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА



# Сертификат

свидетельствует о том, что

*Соболев Роман*

---

принял(а) очное участие во  
II Школе молодых ученых

Основы здорового питания  
и пути профилактики  
алиментарно-зависимых  
заболеваний



23-25 октября  
Москва  
2019

При поддержке  
**РНФ**



Science & Technology City Hall  
Krasnoyarsk | Russia

**IV INTERNATIONAL CONFERENCE  
AGRITECH IV - 2020:  
AGRIBUSINESS, ENVIRONMENTAL  
ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGIES**

## **CERTIFICATE**

THIS IS TO CERTIFY THAT

**YU V FROLOVA, R V SOBOLEV, V A SARKISYAN AND A A KOCHETKOVA**

participated in the IV International Conference "AGRITECH IV - 2020: Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies" in November 18-20, 2020 | Krasnoyarsk, Russia

The research paper «**Approaches to study the oxidative stability of oleogels**» has been reviewed by the Editorial Board, accepted to the Conference Proceedings and sent to Conference Series: Earth and Environmental Science (EES) for further publishing.



**AGRITECH**  
Agribusiness, Environmental  
Engineering and Biotechnologies

**IGOR KOVALEV**  
SCIENTIFIC SUPERVISOR OF  
«AGRITECH IV - 2020»,  
CHIEF EDITOR OF THE VOLUME,  
DOCTOR OF TECHNICAL SCIENCES,  
PROFESSOR





# CERTIFICATE

This is to certify that  
**Roman Sobolev**  
has participated in the international conference  
Food BioTech 2021

General Chair  
Da-Wen Sun

Chair of The Organizing Committee  
Igor V. Baranov

August 24, 2021  
ITMO University, St. Petersburg, Russia





# СЕРТИФИКАТ

УЧАСТНИКА  
СОБОЛЕВ

Роман Владимирович

Третьей национальной научно-практической конференции  
«Пищевые ингредиенты и биологически активные добавки  
в технологиях продуктов питания  
и парфюмерно-косметических средств»

  
 Ректор \_\_\_\_\_ М.Г. Балыхин

При поддержке:



Москва  
27-28 апреля 2021 г

Федеральное государственное автономное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности»

# СЕРТИФИКАТ

III МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ МОЛОДЁЖНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
ПОСВЯЩЁННАЯ ПАМЯТИ Р.Д. ПОЛАНДОВОЙ И 75-ЛЕТИЮ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО  
ФИЛИАЛА ФГАНУ НИИ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

**ПИЩЕВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ БУДУЩЕГО:  
ИННОВАЦИОННЫЕ ИДЕИ, НАУЧНЫЙ  
ПОИСК, КРЕАТИВНЫЕ РЕШЕНИЯ**

**Соболев Роман Владимирович**

*принимает участие в конференции*

КОСТЮЧЕНКО М.Н.  
ДИРЕКТОР ФГАНУ НИИХП

ПАРАХИНА О.И.  
ДИРЕКТОР СПБФ ФГАНУ НИИХП

Лицензия Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки  
на осуществление образовательной деятельности от 18.07.2016 №2274,  
серия 90П01 №0009320

г. Санкт-Петербург, г. Пушкин 11 июня 2021 г.





# СЕРТИФИКАТ УЧАСТНИКА

**Соболев Роман  
Владимирович**

---

**«Церевитиновские  
чтения – 2022»**

ПРОРЕКТОР РЭУ ИМ. Г. В.  
ПЛЕХАНОВА



*В. Г. Минашкин*  
Минашкин В. Г.

**1 апреля 2022 г.  
МОСКВА**



# БЛАГОДАРНОСТЬ

от руководства  
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»  
выражается

**Соболеву  
Роману Владимировичу**

за участие в организации  
**V Школы молодых ученых**  
**«Основы здорового питания и пути профилактики**  
**алиментарно-зависимых заболеваний»,**  
состоявшейся 9-11 ноября 2022 г.



Директор  
ФГБУН «ФИЦ питания и  
биотехнологии»,  
академик РАН

Д.Б. Никитюк

Москва

# СЕРТИФИКАТ

свидетельствует о том, что

*Соболев Роман*

принял(а) очное участие в  
V Школе молодых ученых

Основы здорового питания и пути  
профилактики алиментарно-  
зависимых заболеваний

Москва  
9-11 ноября  
2022



Российский  
научный  
фонд





# СЕРТИФИКАТ УЧАСТНИКА

IX МЕЖДУНАРОДНОЙ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

## «Церевитиновские чтения – 2023»

Соболев Роман Владимирович

ПРОРЕКТОР РЭУ ИМ. Г. В.  
ПЛЕХАНОВА



Минашкин В. Г.

20 апреля 2023 г.

МОСКВА

**HEFD 2021: IV Школа молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. Микронутриенты и минорные биологически активные вещества пищи» с международным участием**

10-12 ноября 2021 г.

# СЕРТИФИКАТ

НАГРАЖДАЕТСЯ

В. А. Саркисян, Р. В. Соболев, Ю. Ф. Фролова, А. А. Кочеткова

за успешное участие в конференции и презентацию доклада

**Взаимодействие витаминов D3 и K2 с пчелиным воском: молекулярно-динамическое моделирование**



А.В. Прогасов  
Генеральный директор

Ассоциация поддержки научных исследований  
Организатор и издатель материалов научных конференций

656049, Россия, г. Барнаул,  
пр-т. Красноармейский, 75Б/62

[www.conferences.science](http://www.conferences.science)



# СЕРТИФИКАТ

УЧАСТНИКА

XVIII Всероссийского конгресса с международным участием  
«Нутрициология и диетология для здоровьесбережения населения России»,  
посвященного 300-летию Российской академии наук

**СОБОЛЕВ РОМАН ВЛАДИМИРОВИЧ**

Научный руководитель  
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,  
академик РАН Тутельян В.А.

Подпись



Директор  
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,  
академик РАН Никитюк Д.Б.

Подпись