

На правах рукописи



ХАРРИС МАРИЯ ОЛЕГОВНА

Исследование влияния фитостеринов на качество пива

Специальность 05.18.15 – Технология и товароведение пищевых продуктов функционального и специализированного назначения и общественного питания

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре товароведения и товарной экспертизы федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова»

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Елисеев Михаил Николаевич

Официальные оппоненты: **Меледина Татьяна Викторовна**
доктор технических наук, профессор
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», факультет пищевых технологий и инженерии, профессор
Грибкова Ирина Николаевна
кандидат технических наук,
всесоюзный научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности - филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН», отдел технологии пивоварения, старший научный сотрудник

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет».

Защита состоится «04» июня 2020 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета Д 212.196.07 на базе ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В.Плеханова» по адресу: 117997, Москва, Стремянный пер., д. 36, корп. 3, ауд. 353.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Научно-информационном библиотечном центре им. академика Л.И. Абалкина ФГБОУ ВО «Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова» по адресу: 117997, г. Москва, ул. Зацепа, д. 43 и на сайте организации: <http://ords.rea.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.х.н., профессор



Чалых Татьяна Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время в связи с изменением потребительского спроса, большое внимание уделяется прогнозированию качества пива при длительных сроках хранения, поскольку торговля должна четко представлять себе риски, связанные с его реализацией, а также понимать, какие параметры могут изменяться, влияя на сроки годности и качество этого напитка брожения. В связи с этим научные разработки в области продления сроков годности и определения тех или иных веществ, влияющих на стабильность пива в период его хранения, имеют первостепенное значение, но на данный момент не определены в нормативных документах. К таким веществам относятся фитостерины - стероидные спирты, входящие в липидной фракции растительного сырья, которые играют важную роль в технологических процессах приготовления пива и формировании его вкуса. Исследование влияния фитостеринов на качество пива актуально, поскольку определение качественного и количественного состава фитостеринов растительного сырья применяемого в производстве пива позволит идентифицировать соответствие зернового сырья, заявленного производителем, использованному сырью при производстве пива. А определение качественного и количественного состава фитостеринов в пиве позволит использовать их в качестве маркеров для определения их влияния на стабильность пива и прогнозирования его стойкости.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы является исследование влияния фитостеринов на качество пива в период его продолжительного хранения. Установление уровня фитостеринов, оказывающего влияние на органолептические показатели и физико-химическую стабильность пива в зависимости от состава сырья, а также разработка критериев оценки качества пива, позволяющих судить о скорости процесса старения в период его хранения.

Для осуществления поставленной цели решались следующие задачи, а именно:

- проведение анализа отечественных и зарубежных источников литературы с целью определения понятия класса веществ «фитостерины», их свойств и форм, а также выявление качественного и количественного содержания фитостеринов в сырье для производства пива и определение процессов, влияющих на качество пива в период его продолжительного хранения;

- проведение мониторинга методов исследования фитостеринов в продуктах питания из растительного сырья и разработка методов их выделения;

- изучение скорости протекания процессов старения пива в зависимости от применяемого сырья с помощью математического анализа данных состава засыпи зернопродуктов;
- обоснование и определение качественного и количественного состава фитостеринов пива, как маркеров его стабильности;
- исследование влияния фитостеринов растительного сырья на процессы старения и стабильность качества пива при хранении с помощью физико-химических показателей согласно международным методикам ЕВС;
- разработка метода прогнозирования стойкости пива на основе определения степени окисления фитостеринов в период его хранения.

Научная новизна. Научно обоснована и экспериментально подтверждена возможность использования метода газовой хроматографии для определения фитостеринов – для различных сортов пива, и высокоэффективной жидкостной хроматографии - для определения фитостеринов пивоваренного сырья; проведен подбор растворителей в соответствии с их элюирующей способностью для оптимального выделения фитостеринов из растительного сырья. Установлены качественный и количественный состав фитостеринов в пивоваренном ячменном солоде, хмеле, и в различных сортах пива отечественного и зарубежного производства. Установлено влияние уровня фитостеринов на органолептические показатели и физико-химическую стабильность пива, изучено их влияния на процессы старения в зависимости от состава сырья, из которого оно было изготовлено.

Разработаны критерии оценки качества пива, позволяющие судить о степени развития процесса старения. Научно обоснованно использование фитостеринов в качестве маркеров для определения стабильности пива и прогнозирования его стойкости.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны методы определения фитостеринов, как критерия, позволяющего судить о степени процесса старения в период его хранения. На основе анализа литературных данных установлена важная роль фитостеринов в процессе хранения пива, влияющих на образование прекурсоров веществ, обуславливающих появление пороков вкуса пива. Впервые разработан метод выделения фитостеринов из растительного сырья, применяемого в технологии производства пива. Разработан метод определения качественного и количественного состава фитостеринов для ячменного солода и хмеля. Изучены и адаптированы методы высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения фитостеринов в разных сортах отечественного и зарубежного пива, и методы газовой хроматографии для определения качественного состава фитостеринов различных сортов

пива.

Разработан метод прогнозирования стойкости пива при хранении и проект документации на метод определения фитостеринов в пиве, позволяющий оценить фитостерины как важный критерий качества с целью мониторинга стабильности коллоидной системы пива в процессе хранения, а также определить соответствие заявленного сырья и применяемого на самом деле.

Методология и методы исследования. При решении поставленных задач применяли общепринятые и специальные методы исследования – физико-химические, аналитические. Для анализа теоретических данных использовали методы регистрации, систематизации, обобщения материалов научных изданий, а также нормативной документации.

Положения, выносимые на защиту

- теоретическое обоснование негативного влияния содержания фитостеринов сырья для производства пива на качество пива в период его продолжительного хранения на основе анализа и систематизации литературных данных;
- база экспериментальных данных качественного и количественного состава фитостеринов в солоде пивоваренном ячменном, хмеле и готовом пиве, необходимая для мониторинга качества пива в процессе его выпуска и хранения;
- разработанные методы определения качественного и количественного состава фитостеринов в пиве, как маркеров его стабильности;
- результаты, характеризующие влияние уровня фитостеринов на процессы старения пива и вклад в органолептическую стабильность пива;
- установленные зависимости содержания фитостеринов в пиве от типа сырья, из которого оно было изготовлено;
- выявленные зависимости скорости протекания процессов старения от состава пивоваренного сырья;
- разработка метода прогнозирования стойкости пива на основе определения степени окисления фитостеринов в период его хранения.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность и обоснованность научных результатов обеспечиваются применением гостированных методик исследования с использованием многократных и параллельных испытаний, с последующей статистической оценкой воспроизводимости результатов анализа, а также сопоставлением полученных результатов с известными из научной литературы, апробацией полученных результатов на на-

учных конференциях и в публикациях.

Результаты диссертационной работы были представлены на VI Всероссийской научно-практической конференции детских диетологов «Питание и здоровье» (Москва 2012), XXVII Международной научно-практической конференции «Наука и современность-2014», X Международной научно-практической конференции «Новое слово в науке и практике: Гипотезы и апробация результатов исследований» (Новосибирск 2014), Международной научно-практической конференции «Технические науки - основа современной инновационной системы» (Йошкар-Ола 2014).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 7 статей, из Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в журнале, цитируемом в наукометрической системе Scopus, 3 материала конференций.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, четырех экспериментов, выводов, списка литературы и приложения. Работа содержит 71 рисунок, 41 таблицу и 1 приложение. Список литературы включает 170 источников российских и зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении диссертации обоснована актуальность работы, определены цели и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость, а также основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе «Роль стеринов растительного сырья, как индикаторов качества пива. Методы их идентификации и определения» представлен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный формам, функциям и свойствам фитостеринов, их влиянию на процесс пивоварения, а также методам выделения фитостеринов и их качественному и количественному анализу с помощью хроматографических методов определения, обобщена научно-техническая информация по методам определения, а также рассмотрена нормативно-правовая база отечественной пищевой промышленности, и пивоваренной отрасли в частности, относительно нормирования содержания фитостеринов в пищевых продуктах и способах их количественной оценки.

Во второй главе «Определение фитостеринов различными хроматографическими методами» описаны объекты исследования: образец светлого солода, хмеля, а также образцы импортного и отечественного пива, качество которых было оценено по соответствующим

ГОСТам, действующим в отрасли: ГОСТ 29294-2014 «Солод пивоваренный. Технические условия», ГОСТ 32912-2014 «Хмелепродукты. Общие технические условия» и ГОСТ 31711-2012 «Пиво. Общие технические условия».

Научно-исследовательская работа проводилась по схеме, приведенной на рисунке 1.

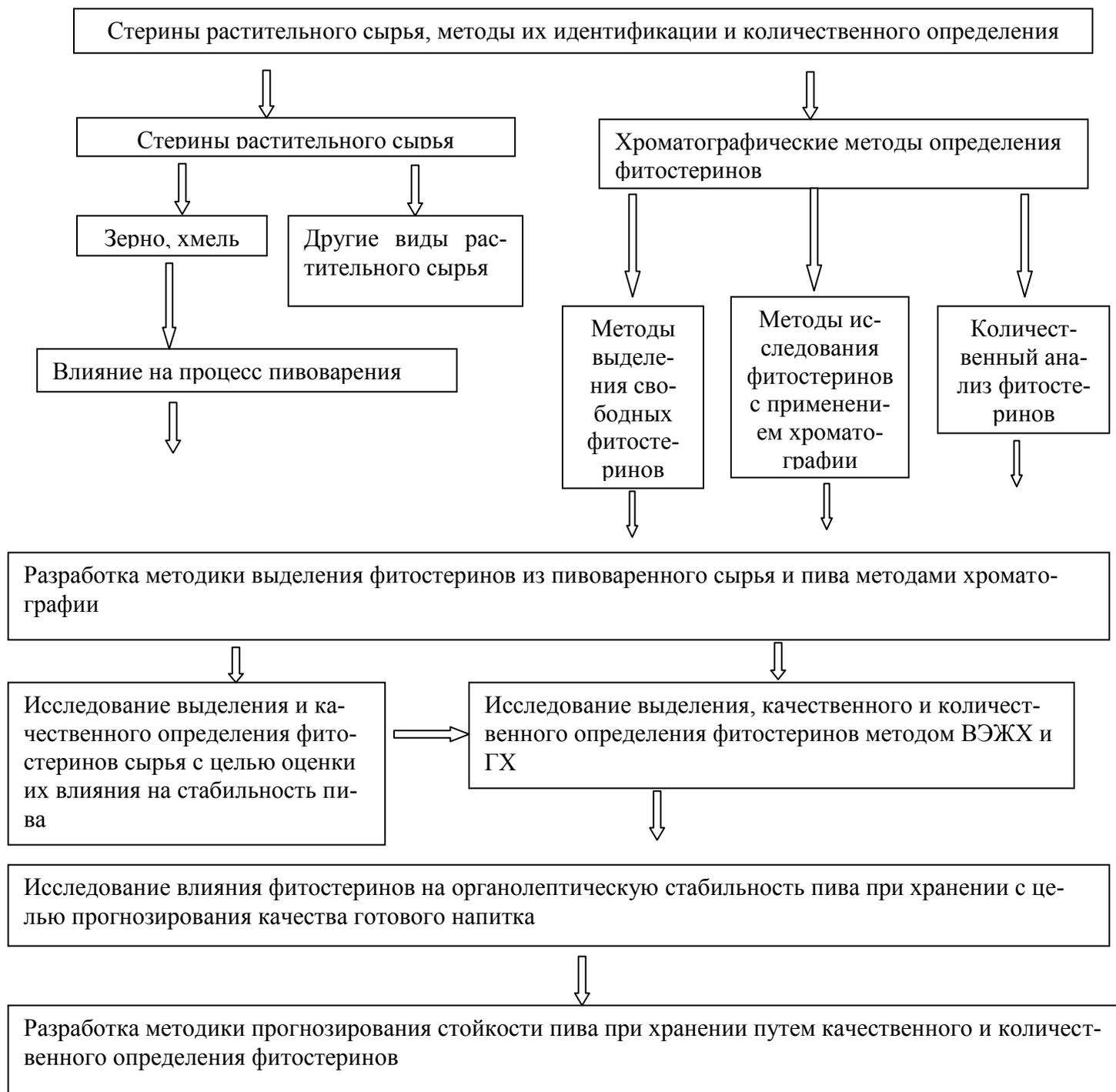


Рисунок 1 – Структура диссертационной работы

В качестве методов исследования использовали обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию со светорассеиванием, а также обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-детектированием с целью исследования фитостеринов в сырье по методу Weihrauch. Для определения растительных стеринов в пивоваренной продукции использовали также высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-детектированием и высокоэффективную газожидкостную хроматографию также с масс-детектированием.

В качестве стандартов для отработки хроматографических методов использовали:

- для определения качественного состава пивоваренного сырья и сусла растворы, содержащие холестерин, β -ситостерин в смеси дихлорметан-этанол фирмы;
- для определения качественного и количественного состава фитостеринов пива использовали растворы, содержащие холестерин, β -ситостерин и кампестерин в смеси дихлорметан-этанол.

Приготовление стандартных растворов для хроматографирования образцов солода, сусла и хмеля. Навеску холестерина массой $100 \text{ мг} \pm 0,001 \text{ г}$ взвешивали на аналитических весах, растворяли в смеси 50 см^3 этанола, 15 см^3 дихлорметана и доводили до метки дистиллированной водой, при необходимости фильтровали. Таким же образом готовили базовый раствор β -ситостерина. Из приготовленного таким образом базовых растворов холестерина и β -ситостерина концентрацией 1 мг/см^3 отбирали по 1 см^3 из каждого раствора и помещали их в мерную колбу на 100 см^3 , растворяли в смеси 50 см^3 этанола и 15 см^3 дихлорметана, далее добавляли в раствор 35 см^3 дистиллированной воды, перемешивали растворы до полного растворения. Время хранения раствора 1 месяц при температуре $4-8^\circ\text{C}$.

Приготовление стандартных растворов для хроматографирования образцов пива. Навеску холестерина массой $100 \text{ мг} \pm 0,001 \text{ г}$ взвешивали на аналитических весах, растворяли в 50 см^3 этанола, 15 см^3 дихлорметана, доводили до метки дистиллированной водой, при необходимости фильтровали. Таким же образом готовили базовый раствор β -ситостерина и кампестерина. Из приготовленного таким образом базовых растворов холестерина и β -ситостерина концентрацией 1 мг/см^3 отбирали по 1 см^3 из каждого раствора и помещали их в мерную колбу на 100 см^3 , растворяли в смеси 50 см^3 этанола и 15 см^3 дихлорметана, далее добавляли в раствор 35 см^3 дистиллированной воды, перемешивали растворы до полного растворения. Время хранения раствора 1 месяц при температуре $4-8^\circ\text{C}$.

Получение фитостеринового комплекса сырья. Экстракцию фитостеринов из солода пивоваренного ячменного, сусла и хмеля гранулированного проводили методом MacMurrey and Morrison (1970), используя дихлорметан.

Разделение фитостеринов сырья проводили двумя методами колоночной жидкостной хроматографией:

- с типом колонки Agilent Hypersil ODS 2.0 x125 mm с детектором Agilent Technologies 1200 Series и детектором по светорассеиванию Alltech 3300 ELSD на сорбенте полиэфирэфиркетоне;
- с масс-детектором LS/MSD Trap SL и детектором Agilent 1100 Series LS/MS; источником ионов АРСІ со скоростью газа распылителя (азота) 10 л/мин и давлением небулайзера 50 psi; температурой газа-осушителя 350°C и энергией разделения 1,2.

Разделение и количественное определение фитостеринового комплекса пива проводили тремя методами колоночной хроматографии:

- с масс-детектором LS/MSD Trap SL и детектором Agilent 1100 Series LS/MS; источником ионов АРСІ со скоростью газа распылителя (азота) 10 л/мин и давлением небулайзера 50 psi; температурой газа-осушителя 350°C и энергией разделения 1,2 и колонкой Agilent Hypersil ODS 2.0 x125 mm;
- с масс-детектором LS/MSD Trap SL и детектором Agilent 1100 Series LS/MS; источником ионов АРСІ со скоростью газа распылителя (азота) 10 л/мин и давлением небулайзера 50 psi; температурой газа-осушителя 350°C и энергией разделения 1,2 и колонкой Symmetry C8 2.1 x150 mm;
- методом газовой хроматографии типа Agilent 7890A GC/MS с масс детектором.

Физико-химические показатели качества пива определяли согласно ГОСТ 31711-2012.

Тиобарбитуровое число определяли фотоколориметрическим методом по ГОСТ Р 55810-2013, мутность пива определяли в ед. ЕВС нефелометрическим способом на мутномере Vos Rota 90/25 Hazemeter (Haffmans, Нидерланды), содержание полифенолов определяли колориметрическим методом, изогумулону – по ИК 10-05031536-127-91, меланоидинов – по методу Колотуши П.В., аминного азота – медным способом.

В главе 2 в п. 2.3 «Определение влияния сырья на содержание фитостеринов в пиве» рассмотрены методы выделения, а также качественного и количественного анализа фитостеринов в пивоваренном сырье и готовой продукции различными хроматографическими методами.

Определение фитостеринов методом ВЭЖХ пивоваренного сырья (солода и хмеля). С целью определения содержания стероинов в пиве исследовался качественный состав последних в исходном сырье – солоде и хмеле, которые являются основным источником возникновения фитостеринов в пиве.

С этой целью осуществлялась пробоподготовка образцов сырья для последующего анализа в следующем порядке:

- около 50 г солода отбирали методом квадратов из объединенной пробы образца, подвергав-

ли измельчению в лабораторной мельнице и из полученного помола отбирали навеску солода массой 5 мг и помещали в мерную колбу на 100 см³, куда последовательно добавляли 10 см³ дистиллированной воды, 5 см³ дихлорметана, смесь перемешали до полного растворения; далее 1 мл приготовленного раствора приливали в полимерную пробирку объемом 15 см³ с герметичной крышкой и центрифугировали в течение 5 мин, после чего для анализа отбирали надосадочную жидкость;

- навеску суслы, массой 5 мг помещали в мерную колбу на 100 см³, куда последовательно добавляли 10 см³ дистиллированной воды, 5 см³ дихлорметана, перемешали до полного растворения и переносили 1 см³ приготовленного раствора в полимерную пробирку объемом 15 см³ с герметичной крышкой, после чего раствор подвергали центрифугированию в том же порядке, как было описано выше;

- около 10 г хмеля отбирали из объединенной пробы, измельчали на мельнице и из полученного измельченного образца отбирали навеску хмеля 5 мг, помещали его в мерную колбу на 100 см³, куда последовательно добавляли 10 см³ дистиллированной воды, 5 см³ дихлорметана, перемешали до полного растворения и из полученной суспензии отбирали 1 см³ в полимерную пробирку объемом 15 см³ с герметичной крышкой и далее проводили центрифугирование как было описано выше.

Для качественного определения фитостеринов растительного происхождения был выбран градиентный режим подачи элюэнта, поскольку данные соединения являются веществами, чувствительными к составу раствора подвижной фазы, поэтому их хроматографируют в градиентном режиме. Условия проведения ВЭЖХ представлены в таблице 1, а влияние состава компонентов подвижной фазы на время удерживания компонентов внутреннего стандарта представлено в таблице 2.

С целью правильной оценки эффективности разделения веществ внутреннего раствора стандарта, вычисляли степень распределения двух компонентов R_s , коэффициент емкости k' , который характеризует удерживание веществ в хроматографической колонке (таблице 3).

Таблица 1 – Параметры хроматографирования

Параметр	Значение
Насос:	
– скорость потока	0,5 м/мин
– длина волны светорассеивания	210 нм
Инжектор	
– объем ввода	5 мкл

Термостат колонок	
– температура	20°C

Таблица 2- Влияние состава подвижной фазы на время удерживания компонентов внутреннего стандарта

Характеристика	Хроматографические параметры подвижной фазы в зависимости от ее состава		
	Содержание (%) дихлорметана (раствор А) +ацетонитрила (раствор В)		Содержание (%) дистиллированной воды (раствор А)+ ацетонитрила (раствор В)
	I вариант	II вариант	III вариант
Время элюирования, мин:			
- 0	А=5, В=95	А=0, В=100	А=5, В=95
- 5	А=5, В=95	-	-
- 15	-	А=20, В=80	А=0, В=100
- 20	-	-	А=0, В=100
- 25	-	-	А=5, В=95
- 30	А=50, В=50	-	-
Время удерживания (t_R), мин:			
- холестерин	3,094	3,837	10,0
- β -ситостерин	3,878	4,844	13,4
- третий компонент	3,467	4,324	11,5

Таблица 3 – Параметры по определению эффективности разделения веществ

Параметр	Вариант хроматографирования		
	I	II	III
Tr_1 , мин	3,094	4,324	11,5
Tr_2 , мин	3,467	4,844	13,4
Tr_3 , мин	3,878	3,837	10,0
To , мин	0,6	1,6	0,7
W_1 , мин	0,4	0,4	0,3
W_2 , мин	0,5	0,4	0,7
Rs , среднее	0,91	0,65	1,8
k' , среднее	4,8	1,7	15,6

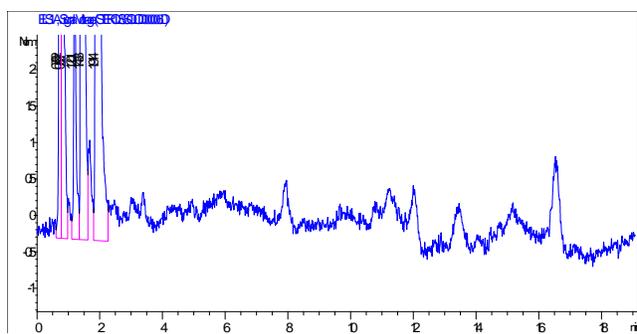


Рисунок 2 - Хроматограмма фитостеринов солода

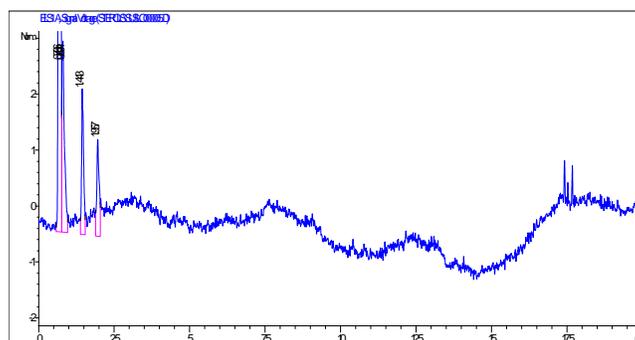


Рисунок 3 – Хроматограмма образца суслу

Данные таблицы 3 показали, что наиболее эффективно применение III варианта состава подвижной фазы для получения калибровочной хроматограммы растворов сравнения. Для достижения оптимального разделения веществ стандарта необходимо добиться максимального разнесения компонентов по времени, о чем и свидетельствует наибольший коэффициент k' и величина R_s больше 1,5 в III варианте.

Таким образом, были получены хроматограммы состава фитостеринов в анализируемых образцах сырья (рисунки 2-3).

Как видно из полученных хроматограмм для солода и суслу (рисунки 2-3), не удалось применить детектирование со светорассеиванием с целью определения качественного и количественного содержания фитостеринов вследствие получения нечеткой картины разделения веществ, это же относится и к образцу анализируемого хмеля.

Таким образом, было принято решение использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с использованием масс-детектора.

После получения калибровочных хроматограмм по раствору внутреннего стандарта, в анализируемых образцах сырья определяли содержание фитостеринов, согласуясь с отработанным режимом их хроматографирования. Хроматографический анализ образца солода представлен на рисунке 4, а хмеля – на рисунках 5-7.

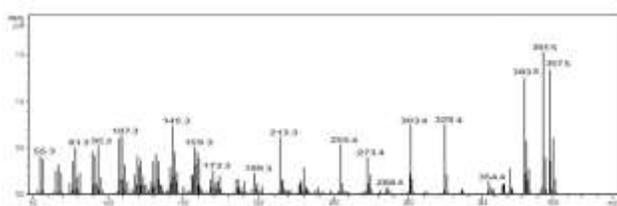


Рисунок 4 – Масс спектрограмма фитостеринов солода (где масс спектрограмма 383,5 соответствует кампестерину, 395,5 – стигмастерину, 397, 5 – β -ситостерину)

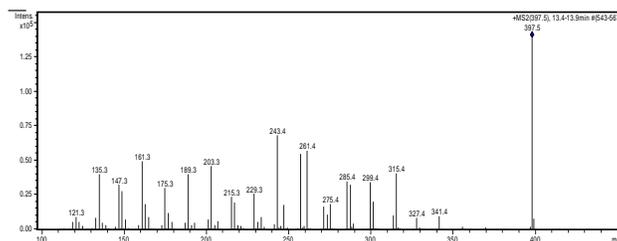


Рисунок 5 – Масс-спектрограмма β -ситостерина в образце хмеля

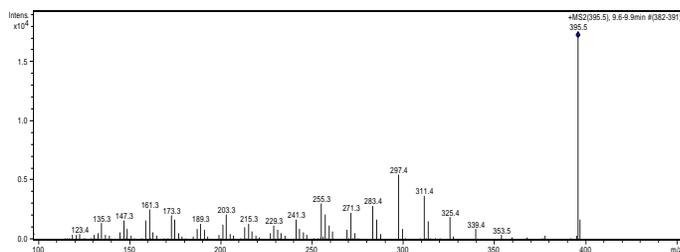


Рисунок 6 – Масс-спектрограмма стигмостерина в образце хмеля

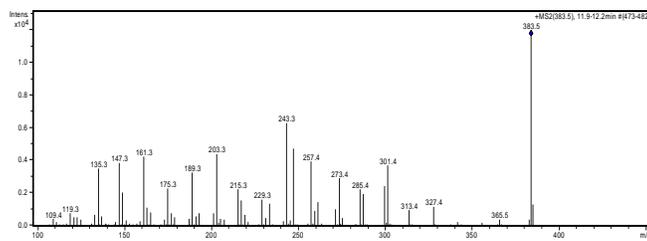


Рисунок 7 – Мас-спектрограмма кампестерина в образце хмеля

Как следует из рисунков 4 - 7, в процессе масс-детектирования образцов солода и хмеля, по молекулярным массам удалось установить наличие следующих фитостероинов: β -ситостерин, стигмастерин, кампестерин, что, на наш взгляд, говорит о том, что солод и хмель являются источниками фитостероинов и в процессе затирания и охмеления переходят сначала в сусло, а затем в пиво, где могут являться, как представители липидной фракции веществ, причинами липидного окисления пива.

Глава 3 «Исследование содержания фитостероинов в пиве методом ВЭЖХ с масс-детектированием и методом ГХ» посвящена разработке методики выделения и определения фитостероинов в образцах пива. Исследовался состав веществ подвижной фазы для разделения индивидуальных фитостероинов раствора внутреннего стандарта по их элюирующей способности:

метанол~ацетонитрил~ацетон~диоксан~тетрагидрофуран~изопропанол, результаты представлены в таблице 4 и на рисунках 8-9.

Таблица 4 - Влияние состава подвижной фазы на время удерживания компонентов внутреннего стандарта

Характеристика	Соотношение компонентов подвижной фазы, %							
	изопропанол (раствор А) +вода (раствор В)					ацетонитрил- тетрагидрофуран (раствор А)+вода (раствор В)		ацетонитрил (раствор А)+вода (раствор В)
№ варианта	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Время илюирования мин:								
- 0	A=100 B=0	A=70 B=30	A=60, B=40	A=30, B=70	A=60, B=40	A=80, B=20	A=50, B=50	A=70, B=30
- 10	A=100 B=0	A=100 B=0	A=80, B=20	A=70, B=30	A=90, B=10	A=85, B=15	A=85, B=15	A=100, B=0
- 15	-	-	A=100, B=0	A=100, B=0	A=100, B=0	-	-	-
- 20	A=100, B=0	A=100, B=0	A=60, B=40	A=30, B=70	A=60, B=40	A=85, B=15	A=85, B=15	A=100, B=0
- 21	A=100,	-	A=60,	A=30,	A=60,	A=80,	A=50,	A=70,

	B=0		B=40	B=70	B=40	B=20	B=50	B=30
Время удерживания (t_R), мин:								
холестерин	-	-	-	-		-	-	8,745
β -ситостерин	-	-	-	-		-	-	10,240
кампестерин	-	-	-	-		-	-	9,435

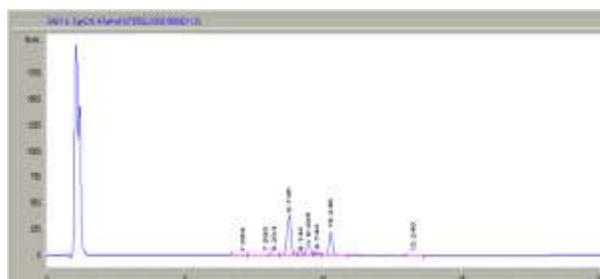


Рисунок 8 – Хроматограммы VIII варианта подвижной фазы

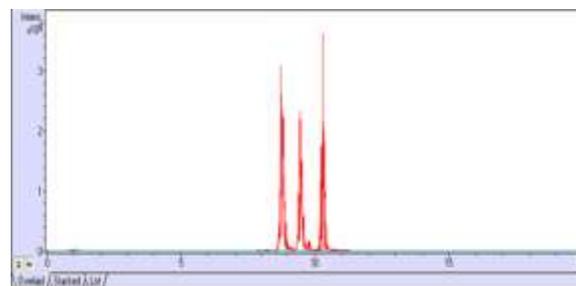


Рисунок 9 - Хроматограмма масс-спектров VIII варианта подвижной фазы

Как показывают данные таблицы 4 и рисунке 8, применение ацетонитрила в сочетании с водой в качестве элюирующих веществ подвижной фазы дало значимое разделение компонентов. Однако, полученные хроматограммы (рисунок 9) не обладали хорошим качеством, что дало основание сменить колонку Agilent Hypersil ODS 2.0x125 mm (C18) на Symmetry® C8 5 μ m 2.1x150 mm при использовании ацетонитрила в качестве растворителя, что позволило получить хроматограмму, представленную на рисунке 10.

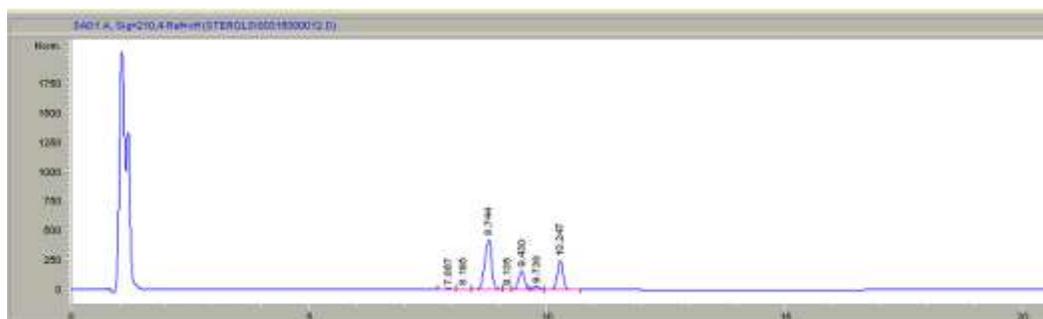


Рисунок 10 – Хроматограмма стандартных растворов при замене колонки

После изменения условий хроматографирования, путем замены колонки, разделение определяемых веществ увеличилось, время удерживания холестерина, кампестерина и β -ситостерина в смеси составило, в минутах: 8,744; 9,430; 10,247 соответственно, что позволило в дальнейшем использовать данный состав подвижной фазы для анализа образцов пива.

Исследовалось несколько методик выделения фитостероидов из пива, поскольку данный объект

не изучен:

- образец пива экстрагировался дихлорметаном;
- образец пива смешивался с соляной кислотой, и затем образцы экстрагировались дихлорметана при нагревании;
- образец пивак смешивался с 20%-ным раствором метанола, перемешивались, далее в пробирки добавляли в следующей последовательности: сульфат аммония, раствор ацетона, раствор гексана, после выдерживания раствора образовавшийся верхний слой, осушивался сульфатом натрия, омылялся метанольным раствором щелочи, после осаждались белковые вещества сульфатом аммония, а оставшиеся фитостерины экстрагировались дихлорметаном.

Пробоподготовок образцов по трем методам не позволила выделить фитостерины из пива с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс - детектированием, поэтому было решено использовать газовую хроматографию с масс-детектированием, для чего изменили метод пробоподготовки пива: в пробу пива вносили внутренний стандарт (для контроля эффективности пробоподготовки), 1Н раствор соляной кислоты; колбы подогревались на водяной бане в течение 30 минут, охлаждались и в каждую колбу вносили насыщенный раствора сульфата аммония, колбы встряхивались 15 минут на шейкере; затем в колбы вносили раствор дихлорметана и встряхивали 15 минут для разделения фаз, и использовали для дальнейшего определения отфильтрованный нижний слой разделенной жидкости, из которого отгоняли растворитель, и экстрагировали содержимое дихлорметаном. Полученные образцы хроматографировали (рисунки 11-18), и по данным хроматограмм были посчитаны концентрации фитостеринов в пиве, представлены в таблице 5.

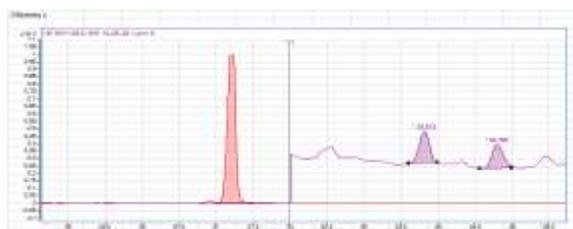


Рисунок 11 – Хроматограмма образца пива Kurshovice Cerne

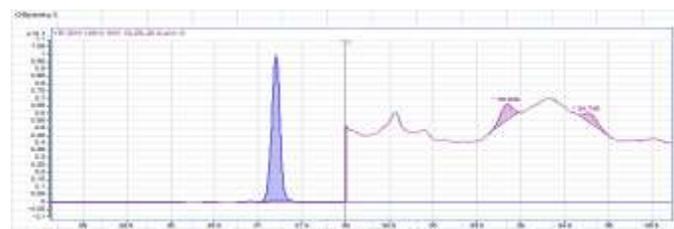


Рисунок 12 – Хроматограмма образца пива Spaten

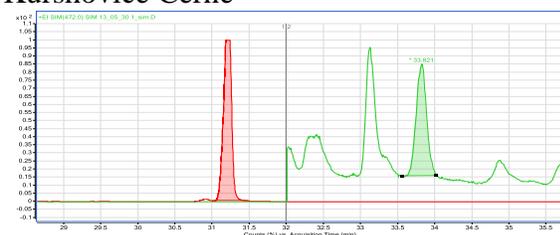


Рисунок 13 – Хроматограммы образца пива Birra Moretti

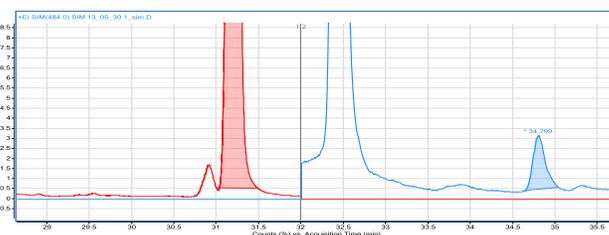


Рисунок 14 – Хроматограммы образца пива Birra Moretti

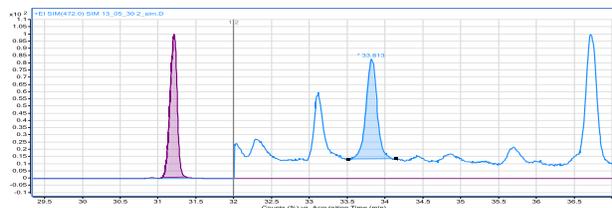


Рисунок 15 – Хроматограммы образца пива Tsingtao

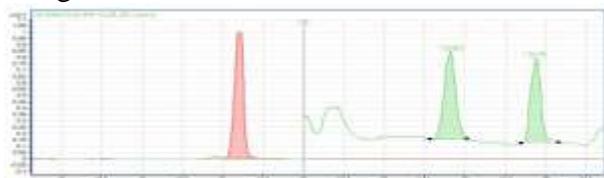


Рисунок 17 – Хроматограмма образца Lowenbrau

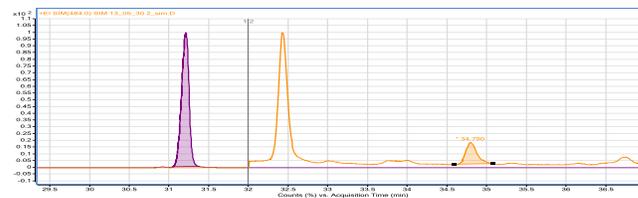


Рисунок 16– Хроматограммы образца пива Tsingtao

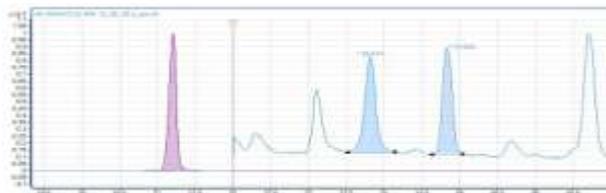


Рисунок 18 – Хроматограмма образца Жигули барное

Таблица 5 - Содержание фитостерина в различных сортах пива

Название сорта пива	Содержание, мкг/дм ³	
	кампестерина	стигмостерина
«Kurshovice Cerne»	29,4	25,3
«Birra Moretti»	10,5	9,8
«Spaten»	21,0	11,7
«Tsingtao»	7,9	6,5
«Lowenbrau»	18,5	9,9
«Жигули барное»	15,4	9,8

Необходимо отметить тот факт, что в отечественных образцах пива «Туборг» (лицензионное) и «Три медведя» фитостерины находились ниже предела обнаружения при их определении методами газовой хроматографии, что говорит о низком содержании в них солода, а также о замене солода на ячмень, глюкозо-мальтозные сиропы и др. сахаросодержащее сырье.

Полученные данные качественного и количественного состава фитостерина сырья и готового пива показали, что источником фитостерина – стигмастерина и кампестерина – является используемое растительное сырье – солод, ячмень и хмель, но после брожения в готовом пиве остаются только кампестерин и стигмастерин, что свидетельствует о большей реакционной способности β -ситостерина, который преобразовывается в технологическом процессе в карбонильные соединения, либо полностью используется дрожжами как ростовое вещество.

Глава 4 «Исследование влияния фитостерина на качество пива в процессе его старения» посвящена исследованию влияния фитостерина на сдвиг сенсорной стабильности пива.

Фитостерины, как представители липидов, содержащиеся в незначительном количестве, осуществляют свой вклад в нарушение стабильности вкуса хранящегося пива посредством образования транс-2-ноненаля, поэтому исследование степени влияния фитостеринов на физико-химические и органолептические параметры пива имеет важное значение, поскольку литературных данных об этом процессе не было найдено.

С целью изучения вклада фитостеринов в процессы окисления, в течение которого изменяются многие соединения пива, что приводит к сдвигу коллоидного равновесия, исследование проводилось посредством 2-х этапов:

1 этап – Определение физико-химическими методами степени нарушения коллоидного равновесия в пиве, позволяющими оценить риски окислительных процессов.

2 этап – При возникновении окислительных процессов более детальное исследование пива - определение количества фитостеринов хроматографическими методами.

Для достижения сдвига коллоидного равновесия применяли метод так называемого «искусственного» старения пива, способы достижения которого представлены в таблице 6.

Таблица 6– Способы старения пива

№ пп	Название метода	Температурные и временные условия метода			
		1 этап		2 этап	
		t, °C	τ, сут	t, °C	τ, сут
1	Метод ЕВС	60	7	0	1
2	Метод Каглера	0	0,25	66	0,67
3	Ускоренный тест	40	2	0	1
4	Метод Грабка	0	7	45	3
5	Метод Шапона	-5	40 мин	-	-

Исследование влияния методов старения на качество пива выявили изменения в органолептических (сенсорных) показателях пива. Выбор перечня измеряемых дескрипторов был основан на оттенке запаха и привкуса основных соединений, отвечающих за сенсорную нестабильность пива, связанных образованием транс-2-ноненаля. Органолептическая дескрипторная оценка пива показала, что у большинства образцов до обработки вкус характеризовался как сбалансированный, хорошо выраженный солодовый, с хмелевой горечью, без посторонних тонов. Температурная обработка привела к накоплению окисленных, затхлых и серных тонов во вкусе, которых не было в исходных образцах пива.

Исследования показали, что процесс обработки различными способами старения пива, наиболее заметнее на вкус оказывает влияние метод ЕВС, который приводит к образованию в пиве альдегидных, окисленных, хлебных тонов, которые наиболее интенсивно влияют на вкус пива из

всех выбранных способов. Метод Каглера приводит также к изменению органолептических показателей, но в пиве сохраняется хмелевой аромат, солодовый вкус, но примешиваются окисленные тона.

Ускоренный тест влияет сильнее метода Каглера на профили пива, но не так интенсивно как метод ЕВС: в образцах заметны фенольные, окисленные, хлебные тона, отсутствует хмелевой аромат пива.

Метод Грабака приводит к образованию в пиве прокислых, альдегидных и хлебных тонов, но сохраняет оттенок хмелевого тона в напитке.

Второй подэтап включал исследования влияния процесса старения пива на физико-химические показатели пива: мутность, содержание метаноидинов, содержание аминного азота, полифенолов, тиобарбитуровое число, содержание фитостеринов, которые более информативно могут свидетельствовать о происходящих процессах в пиве при старении, а показатель тиобарбитуровое число – показать связь между окислением липидной фракцией и окислением пива.

Как показали полученные данные, метод Шапона и метод Каглера значительно не влияют на процессы старения пива, лишь приводят к обратимому сдвигу коллоидной стабильности, поскольку незначительно повышается мутность на фоне практически не изменяющихся физико-химических показателей.

Наибольший вклад в нарушение коллоидного равновесия, если судить по тиобарбитуровому числу, кислотности, содержанию изогумулона, внес метод определения коллоидной стойкости по ЕВС – мутность пива превышает значение 2 ед. мутности, и все контролируемые показатели превышают те же значения в других образцах значительно, данные представлены на рисунках 19-22.

В течение обработки всех образцов пива этим способом старения, происходит наиболее значимое снижение содержания аминного азота, что коррелирует с литературными данными, в которых отмечается снижение уровня глутатиона, метионина, фенилаланина, гистидина и тирозина в пиве, хранящемся 6-9 месяцев, также было подтверждена корреляция между ухудшением вкуса пива (образованием карбониллов старения) и снижением уровня аминокислот в пиве.

Концентрация полифенолов уменьшается за счет образования белково-дубильных комплексов с образованием коллоидного помутнения, что подтверждает уровень мутности образцов пива. Как видно из рисунка 20, снижение концентрации полифенолов связано с нарастанием ТБЧ, что говорит о взаимосвязи окисления липидной фракции и окислением полифенолов в пиве при старении.

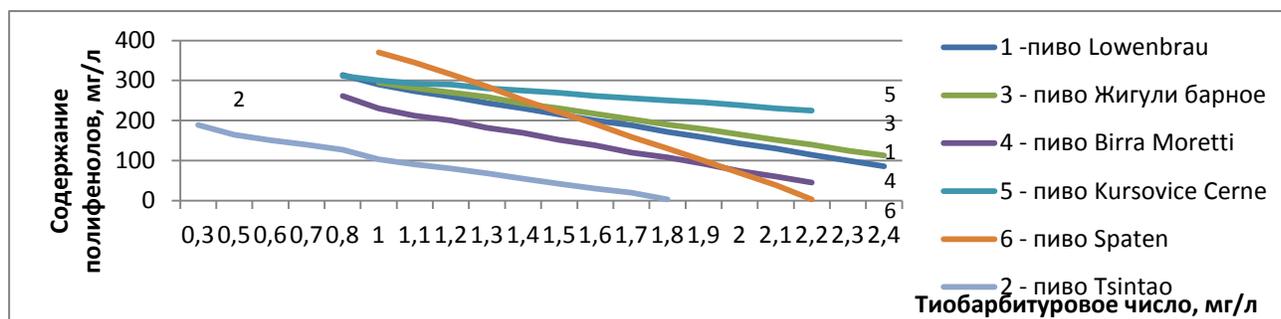


Рисунок 19 – Изменение содержания полифенолов в зависимости от ТБЧ пива

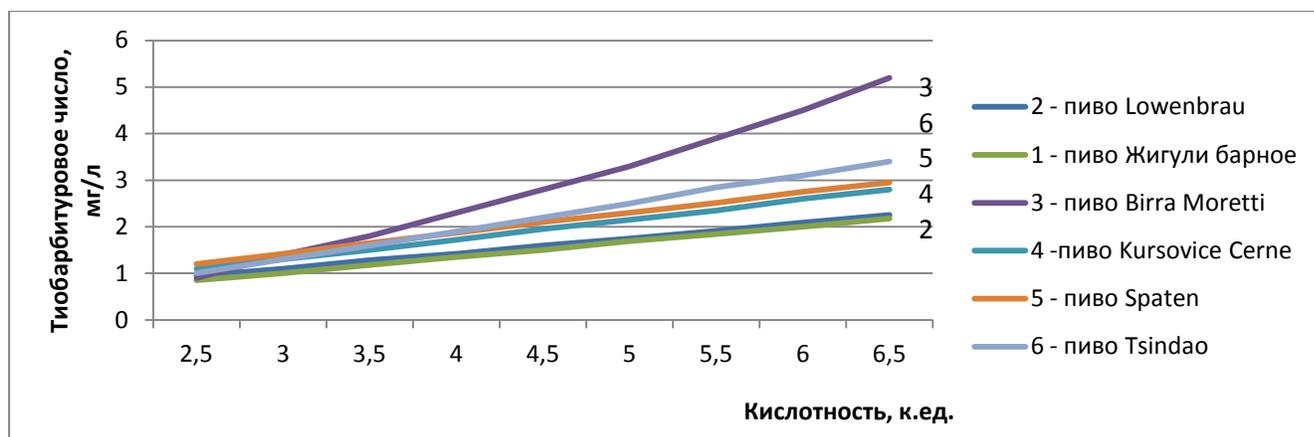


Рисунок 20 – Изменение кислотности пива в зависимости от тиобарбитурового числа

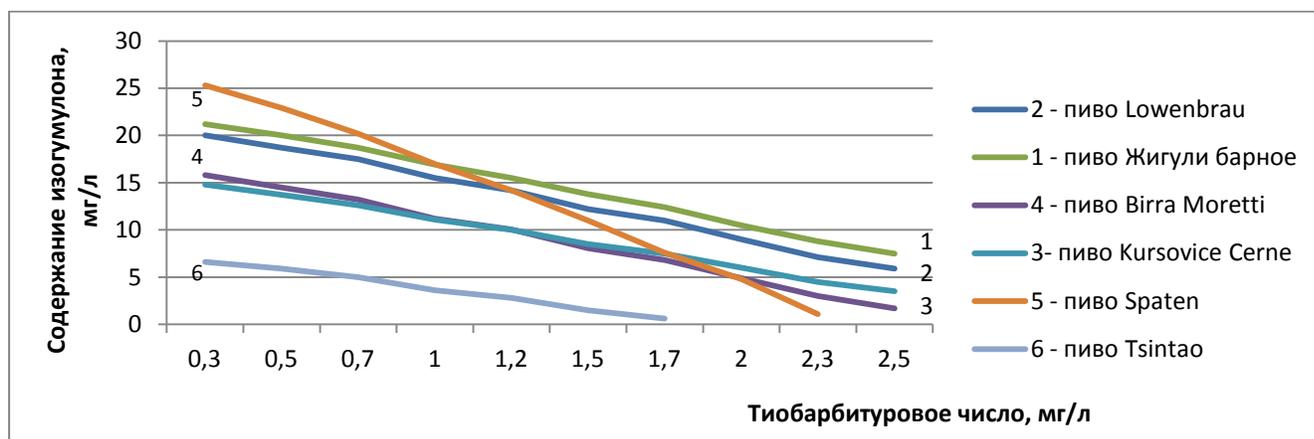


Рисунок 21 – Изменение содержания изогумулона в зависимости от ТБЧ

Кислотность пива увеличивается за счет образования альдегидов, эфиров, карбониллов старения, что, с другой стороны, подтверждается возрастанием тиобарбитурового числа, характеризующего степень окисления органических соединений (см. рисунок 20).

Содержание изогумулона снижается за счет его окисления, что подтверждается как органолептическими, так и физико-химическими показателями пива (см. рисунок 21).

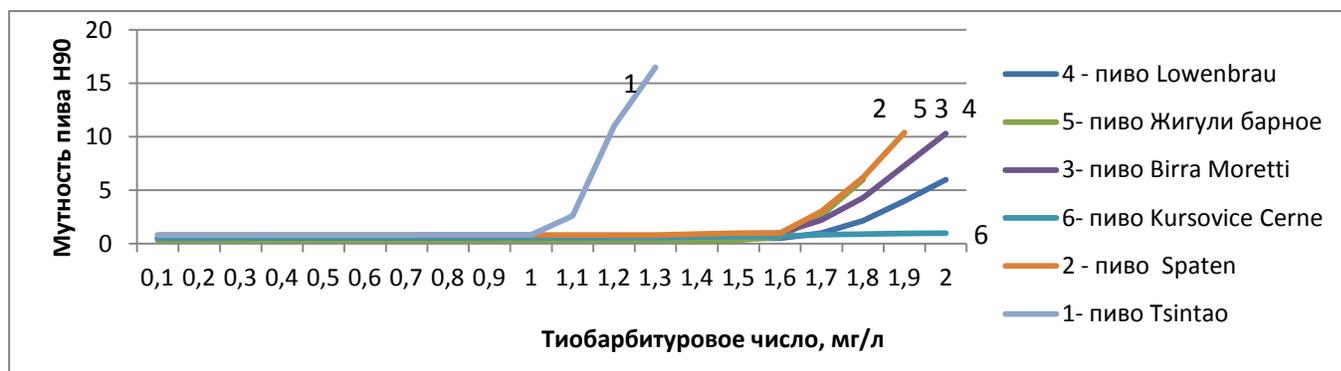


Рисунок 22 – Изменение мутности Н90 в зависимости от ТБЧ

Мутность пива также менялась в зависимости от изменения тиобарбитурового числа (см. рисунок 22).

Причем, необходимо отметить, что смещение равновесного состояния у разных образцов пива происходит с разной интенсивностью. Так, у пива «Tsingtao» оно происходило ранее, а характер изменения мутности пива «Kurshovice Cerne» вообще отличался от других образцов пива, что объясняется использованием различного зернового и сахаросодержащего сырья в технологии его производства – в пиве «Tsingtao» применяется рис как несоложеное сырье, а в пиве «Kurshovice Cerne» присутствует темный солод, соответственно содержание меланоидинов в нем наибольшее из всех образцов.

Полученные графики были математически изучены и получены уравнения зависимостей с помощью программы Excel (данные таблицы 7).

Таблица 7 – Уравнения основных зависимостей при исследовании методов старения пива на основании рисунков 19-22

Наименование пива	Уравнение зависимости содержания			
	Полифенолов от ТБЧ	ТБЧ от кислотности	Изогумулона от ТБЧ	Мутности (Н90) от ТБЧ
№ завис-ти	1	2	3	4
Lowenbrau	$y = -145x + 432,5$	$y = 0,32x + 0,14$	$y = -6,3x + 21,8$	$y = 6,13x^2 - 22,68x + 23,1$ для $x > 1,65$
Жигули барное	$y = -130x + 425$	$y = 0,34x$	$y = -6,3x + 23,1$	$y = 3,38x^2 - 15,21x + 17,45$ для $x > 1,5$
Birra Moretti	$y = -156x + 386$	$y = 0,64x - 1,3$	$y = -6x + 17,5$	$y = 6,3x^2 - 20,16x + 25,42$ для $x > 1,6$
Kurshovice Cerne	$y = -162x + 362$	$y = 0,42x + 0,04$	$y = -5x + 16$	$y = 1,37x^2 - 3,2x + 2,16$ при $x > 1,15$
Spaten	$y = -152x + 449$	$y = 0,42x + 0,16$	$y = -12,1x + 29$	$y = 4,15x^2 - 13,28x + 16,55$ для $x > 1,6$
Tsingtao	$y = -61x + 166$	$y = 0,9x - 0,63$	$y = -4,4x + 3,7$	$y = 4,46x^2 - 6,69x + 9,9$ для $x > 0,8$

Как видно из данных таблицы 7, зависимости №1-3 носят линейный характер. Если рассматривать зависимость изменения полифенолов от ТБЧ, то есть изменения фитостеринов, то можно заметить близкий по значению коэффициент при переменной всех образцов пива, кроме «Tsingtao», что можно объяснить разницей в используемом на приготовление пива, сырье: в образце пива «Tsingtao» более преобладает несоложеное сырье, что подтверждается органолептическим характером и физико-химическими показателями, полученными в ходе исследований процесса старения образцов пива. Остальные образцы пива в той или иной степени содержат преобладающее количество солода.

Изменение протекающих окислительных процессов согласуется с коэффициентами при переменных в уравнениях таблицы 7 - наибольшей скоростью протекания окислительных процессов, характеризующихся индексом ТБЧ, косвенно характеризующим изменение фитостеринов, из сортов пива характеризуется пиво «Tsingtao», поскольку коэффициент при переменной в уравнении у него больший.

Анализ полученных данных (таблица 7 и рисунки 19-22) указывает на непосредственное влияние окисления липидной фракции, то есть фитостеринов, на окислительные изменения (индекс ТБЧ), происходящие в пиве. Данные окислительные процессы в дальнейшем могут повлиять на вкус и состав готового пива, а его состав может быть охарактеризован с его помощью.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что существует зависимость между окислением липидной фракции, то есть фитостеринов, и процессами старения пива, проходящими с разной интенсивностью у образцов, приготовленных только из солода и солода и несоложеного зерна, которые различаются по уровню главных антиокислительных соединений – полифенолов, меланоидинов, фитостеринов, при критическом сдвиге коллоидного равновесия в пиве. Представляется целесообразным изучить корреляцию изменения индекса ТБЧ, характеризующего изменение липидной фракции, и непосредственно содержание фитостеринов в образцах пива, в зависимости от косвенных показателей.

На втором этапе исследовалось влияние фитостеринов на окислительные процессы в пиве. Наибольший вклад в сдвиг коллоидного равновесия пива внес метод ЕВС, и, следовательно, он был взят за основу для изучения влияния фитостеринов как представителей липидной фракции на окислительные процессы, то есть уровень ТБЧ, в готовом пиве.

Пробоподготовка образцов пива проводилась без изменений, условия хроматографирования были те же, и они показали наличие определяемых фитостеринов в образцах пива, данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Содержание фитостерина в различных сортах пива до и после обработки

№ пп	Название сорта пива	Содержание, мкг/дм ³			
		кампестерина		стигмостерина	
		до обработ-ки	после обра-ботки	до обработ-ки	после обра-ботки
1	«Kurshovice Cerne»	29,4	1,7	25,3	1,3
2	«Birra Moretti»	10,5	0,6	9,8	0,5
3	«Spaten»	21,0	0,6	11,7	0,4
4	«Tsingtao»	7,9	-	6,5	-
5	«Löwenbrau»	18,5	1,1	9,9	0,6
6	«Жигули барное»	15,4	0,9	9,8	0,5

Как видно из данных таблицы 8, искусственное старение пива методом ЕВС приводит к уменьшению концентрации фитостерина в 17-35 раз, а в некоторых случаях содержание фитостерина ниже порога их обнаружения, причем более термолабильным оказался стигмостерин по сравнению с кампестерином.

Наибольшим значением по содержанию фитостерина после искусственного старения обладало темное пиво «Kurshovice Cerne». На наш взгляд, это коррелирует с изменением индекса ТБЧ – в данном образце тиобарбитуровое число увеличивается меньше всего по сравнению с другими образцами. По-видимому, это объясняется применением в производстве данного пива темного и карамельных сортов солодов по рецептуре.

В таблице 9 представлены образцы пива в порядке убывания индекса ТБЧ и содержания фитостерина.

Таблица 9 – Содержание ТБЧ и фитостерина в образцах пива

№	Наименование образца пива	Содержание в пиве						
		Тиобарбитуровое число, мг/дм ³			Фитостерина, мкг/дм ³			
		исходное	После обработки*	Увеличение, раз	Исходное		после обработки	
				камп.	стиг-маст.	камп.	стиг-маст.	
1	«Kurshovice Cerne»	1,17	1,87	1,6	29,4	25,3	1,7	1,3
2	«Lowenbrau»	1,17	2,03	1,74	18,5	9,9	1,1	0,6
3	«Жигули барное»	1,03	1,71	1,75	15,4	9,8	0,9	0,5
4	«Birra Moretti»	0,68	1,25	1,84	10,5	9,8	0,6	0,5
5	«Spaten»	1,00	1,87	1,86	21,0	11,7	0,6	0,4
6	«Tsingtao»	0,78	1,92	2,5	7,9	6,5	-	-

* после обработки – имеется ввиду применение метода ЕВС для искусственного старения пива

Таким образом, есть четкая зависимость между индексом ТБЧ и содержанием фитостерина в пиве: чем больше содержание фитостерина, тем меньше индекс ТБЧ, что говорит о коллоидном

равновесии пива, то есть о высоких качественных показателях готового напитка.

Основываясь на вышесказанном, подтвердилась наша гипотеза о том, что фитостерины в пиве не могут себя полностью охарактеризовать как антиоксиданты, и сами окисляются в процессе нарушения коллоидного равновесия.

С целью нахождения численной зависимости содержания фитостеринов от индекса ТБЧ, задействовались данные по светлому солодовому пиву, исключая темное «Kurshovice Cerne» и светлое, но приготовленное с применением несоложенного сырья, «Tsingtao».

Получаются следующие значения (содержание фитостеринов усреднялось):

1,2 мг/дм³ ТБЧ соответствует 14,2 мкг/дм³ фитостеринов

1,0 мг/дм³ ТБЧ соответствует 12,6 мкг/дм³ фитостеринов

0,7 мг/дм³ ТБЧ соответствует 10,2 мкг/дм³ фитостеринов

Иначе говоря, 1 мг/дм³ ТБЧ соответствует 12,6 мкг/дм³ фитостеринов в исходном пиве.

Для того чтобы охарактеризовать достоверность получившихся зависимостей содержания фитостеринов или изменения ТБЧ, от измеряемых косвенных показателей нарушения коллоидного равновесия пива, а также вклада фитостеринов в изменение равновесного состояния пива, использовался математический анализ полученных уравнений зависимостей (данные таблицы 7) – корреляционный и регрессионный анализ, программа Statistica, в результате которого была доказана связь окисления фитостеринов как липидной фракции с изменением содержания веществ в коллоидной системе пива. Многофакторный анализ выявил корреляционную взаимосвязь между изменением тиобарбитурового числа и таких показателей как содержание полифенолов, изогумулону и аминного азота, то есть показал зависимость изменения фитостеринов от перечисленных показателей, и подтвердил то, что фитостерины действительно вносят вклад в нарушение стабильности коллоидной системы пива при окислении.

В главе 4 пп. 4.2 «Разработка метода прогнозирования стойкости пива на основе определения количества фитостеринов в пиве» обоснована и представлена разработанная методика прогнозирования стойкости пива на основе полученным нами зависимостей, предполагающая следующие исследования.

В качестве маркера стойкости пива на первом этапе предварительно проводится анализ ТБЧ в исходном пиве по ГОСТ Р 55810-2013.

Причем его содержание в исходном пиве не должно превышать 0,7-1,2 мг/дм³ – это касается как светлого, так и темного пива. Увеличение данного значения до 2,0 мг/дм³ и выше влечет за собой расширенный анализ, поскольку есть риск возникновения окислительных процессов, что говорит о снижении качества пива.

На втором этапе рекомендуется контролировать содержание фитостеринов по разработанному методу, влияющих на образование веществ-прекурсоров, ответственных за ухудшение органолептических показателей и появление пороков вкуса пива. Данный показатель позволяет оценить возникающие риски при реализации готовой продукции.

Содержание кампестерина в темном пиве должно быть на уровне 28-30 мкг/дм³ и более, в светлом пиве этот показатель должен быть не менее 15 мкг/дм³. По содержанию стигмастерина темное пиво должно иметь этот показатель на уровне 20-25 мкг/дм³ и более, а светлое пиво – не менее 9,5 мкг/дм³. Снижение содержания фитостеринов до уровня 2 мкг/дм³ и ниже или их обнаружение говорит о том, что в пиве произошли необратимые изменения, влекущие за собой появление вкусовых пороков.

Показатель содержания фитостеринов пива важно контролировать в течение хранения с целью повышения качества реализуемой продукции.

ВЫВОДЫ

Основным результатом работы является разработка метода прогнозирования стойкости готового пива на основе исследования влияния вклада фитостеринов на качество этого напитка брожения при окислительных процессах в течение хранения до реализации в торговой сети, а также по составу фитостеринов выявлена возможность определения соответствия применяемого сырья с заявляемым на этикетке пива.

При разработке метода определения фитостеринов в пиве получены следующие основные результаты:

- 1 Разработан метод выделения фитостеринов из пивоваренного солода и хмеля, метод ВЭЖХ с градиентной подачей ацетонитрила в качестве жидкой фазы и масс-детектированием позволил достоверно определить в сырье β -ситостерина, стигмастерина и кампестерина.
- 2 Разработан метод выделения фитостеринов из пива с применением растворителя дихлорметана в сочетании с кислотным гидролизом соляной кислотой и их дальнейшего количественного определения методом ГХ.
- 3 Установлено, что в пиве основными фитостеринами являются кампестерин и стигмастерин, причем их содержание зависит от применяемого в технологии пива сырья: применение 100% солода при затирании обеспечивает уровень фитостеринов около 30 мкг/дм³, включение несоложенного сырья приводит к снижению уровня фитостеринов до 7 мкг/дм³. Обоснована возможность применения фитостеринов с целью идентификации и сопоставления указанного на этикетке производи-

телем состава сырья готовой продукции фактическому.

4 Разработан метод прогнозирования стойкости пива, на основе определения степени окисления фитостеринов в период хранения и реализации напитка.

5 Изучено влияние скорости протекания процессов старения пива на физико-химические и органолептические показатели пива, в зависимости от применяемого сырья и выявлено влияние фитостеринов на процесс старения пива, вклад фитостеринов в органолептическую стабильность пива.

6 Установлена зависимость скорости протекания процессов старения пива от применяемого сырья с помощью математического анализа данных: наличие несоложенного сырья в засыпи при затирании приводит к ускорению окисления основных соединений, отвечающих за стабильность вкуса и сохранения коллоидной системы в равновесии. Впервые показана линейная зависимость изменения содержания полифенолов, кислотности, изогумуллона и параболическая зависимость изменения мутности от изменения ТБЧ. Сильную корреляционную связь выявил проведенный корреляционно-регрессионный анализ, что показывает влияние липидной фракции фитостеринов на процессы старения пива.

7 Экономическая эффективность от определения фитостеринов на производстве и прогнозирования их влияния на стабильность пива для крупного пивоваренного производства с годовым выпуском продукции 1 млн дал составит 4,2 млн руб. в год.

Публикации по теме диссертации:

Публикации в изданиях, входящих в наукометрическую систему Scopus:

1 Rapota M.O. Extraction of lipids from the raw materials for beer production and development of methods for phitosterols' determination by high performance liquid chromatography (HPLC)/ M.O.Rapota, Y.A. Tyrsin//Biology and Medicine – 2015. – V.7 (1). – pp. 1436-1440.

Публикации в изданиях, входящих в перечень ВАК:

2 Рапота, М.О. Выделение общих липидов из сырья для производства пива и разработка методики определения в них фитостеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)/ М.О. Рапота, Ю.А.Тырсин// Инновации и инвестиции. – 2014. - №5. – С. 202-204.

3 Рапота, М.О. Влияние фитостеринов на сенсорную стабильность пива/М.О.Рапота, Ю.А.Тырсин//Перспективы науки. – 2015. - №5. – С.26-30.

4 Рапота, М.О. Обнаружение фитостеринов в пиве/М.О.Рапота, Ю.А.Тырсин//Инновации и инвестиции. – 2015. - №7. – С. 147-150.

5 Рапота, М.О. Влияние фитостеринов на сенсорную стабильность пива/М.О. Рапота, М.Н. Елисеев// Успехи современной науки и образования. – 2016. – Т.2. - № 8. – С. 163-166.

6 Харрис, М.О. (Рапота М.О.) Разработка методики прогнозирования стойкости на основе определения количества фитостеринов в пиве/ М.О. Харрис, М.Н. Елисеев// Товаровед продовольственных товаров. – 2018. - №2. - С. 14-19.

7 Харрис, М.О.(Рапота М.О.) Вопросы идентификации зернового состава пива/ М.О. Харрис, М.Н. Елисеев// Пиво и напитки. – 2018. - № 2. – С. 46-51.

Публикации в других изданиях (материалы конференций):

8 Рапота, М.О. Регулирование содержания фитостеринов и их роль в продуктах питания/М.О.Рапота, Ю.А.Тырсин//Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции детских диетологов «Питание и здоровье», г. Москва. – 2012. – С. 102.

9 Рапота, М.О. Исследование фитостеринов в продовольственных продуктах на примере сырья для производства пива методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/ М.О.Рапота, Ю.А.Тырсин, В.В.Бессонов//Материалы III Международной научно-практической конференции «Технические науки – основа современной инновационной системы», г. Йошкар-Ола. – 2014. – С. 79-83.

10 Рапота, М.О. Выделение общих липидов из сырья для производства пива и разработка методики определения в них фитостеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)/М.О.Рапота, Ю.А.Тырсин// Материалы X Международной научно-практической конференции «Новое слово в науке и практике: Гипотезы и апробация результатов исследований», г. Новосибирск. – 2014. – С.25-27.