

УДК 577.112.083:637.068(045)

**Е. Д. Шегидевич<sup>1</sup>, З. Е. Егорова<sup>2</sup>**<sup>1</sup> РУП «Институт мясо-молочной промышленности»<sup>2</sup> Белорусский государственный технологический университет**ПОДГОТОВКА МОДЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ  
ФАЛЬСИФИКАЦИИ МОЛОКА-СЫРЬЯ ПО БЕЛКОВОМУ СОСТАВУ  
МЕТОДОМ ДЕНАТУРИРУЮЩЕГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

Проведены расчеты и подготовлены модельные образцы молока-сырья, содержащие дополнительные компоненты молочного и немолочного происхождения. В качестве базового образца использовали молоко-сырье с массовой долей белка, равной 3,0%. Для имитации фальсификации молока-сырья в базовый образец вносили следующие белоксодержащие компоненты: сухую деминерализованную молочную сыворотку, заменитель цельного молока на основе молочной сыворотки, изолят соевого белка. Проводили анализ модельных образцов методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Подготовленные модельные образцы применимы в качестве образцов сравнения при проведении идентификации белкового состава молока-сырья методом денатурирующего электрофореза с целью выявления его фальсификации. Использование подготовленных образцов дает возможность прогнозирования количества дополнительно внесенного белоксодержащего компонента.

**Ключевые слова:** модельные образцы, денатурирующий электрофорез, фальсификация, белковый состав, молоко-сырье.

**E. D. Shegidevich<sup>1</sup>, Z. E. Yegorova<sup>2</sup>**<sup>1</sup> RUE “Institute for Meat and Dairy Industry”<sup>2</sup> Belarusian State Technological University**MODEL SAMPLES PREPARATION FOR DETECTING RAW MILK  
ADULTERATION ON THE PROTEIN COMPOSITION BY THE METHOD  
OF DENATURING ELECTROPHORESIS**

Calculations have been made and model samples of raw milk containing additional components of dairy and non-dairy origin have been prepared. Raw milk with a protein mass fraction equal to 3.0% was used as a base sample. To simulate the adulteration of raw milk, the following protein-containing components were introduced into the base sample: dry demineralized milk whey, calf milk replacer based on whey, isolate of soy protein. Model samples were analyzed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis.

Prepared model samples are applicable as reference samples when the protein composition of raw milk is identified by the method of denaturing electrophoresis in order to detect its adulteration. The use of prepared samples makes it possible to predict the amount of additionally added protein-containing component.

**Key words:** model samples, denaturing electrophoresis, adulteration, protein composition, raw milk.

**Введение.** Все компоненты молока имеют существенное значение в физиологии питания человека. Наиболее ценным биологическим компонентом молока является белок, так как образующиеся при его расщеплении аминокислоты принимают участие в построении клеток организма, синтезе ферментов и гормонов. Белки молока содержат все незаменимые аминокислоты и относятся к полноценным [1]. Следует добавить, что массовая доля белка в молоке – значимый технологический параметр, на основании которого устанавливаются нормы расхода сырья и проводятся материально-сырьевые расчеты при производстве некоторых групп молочных продуктов.

Указанные достоинства молока-сырья являются основной причиной существующей

проблемы его фальсификации по содержанию белка путем внесения дополнительных компонентов: небелковых азотистых соединений, сухих молочных компонентов, белков растительного происхождения [2]. Указанные способы позволяют искусственно повысить массовую долю белка (азота) и, соответственно, получить материальную выгоду при сдаче молока-сырья в переработку. Несмотря на многочисленные исследования по выявлению фальсификации белка молока-сырья различными физико-химическими методами [3], универсальная методика идентификации искусственно добавленных белков до сих пор не разработана.

Денатурирующий электрофорез является одним из методов, применяемых для идентификации белкового состава различных пищевых

матриц. Однако при его использовании возникает необходимость в наличии модельных образцов для проведения сравнительной оценки исследуемых объектов. Разработка модельных образцов для выявления фальсификации молока-сырья по белковому составу с использованием метода денатурирующего электрофореза являлась целью данной работы.

**Основная часть. Объекты и методы исследования.** Объектами исследований были образцы молока-сырья (базовый образец) и белоксодержащие компоненты (сухая деминерализованная молочная сыворотка (сыворотка ДМ), заменитель цельного молока на основе молочной сыворотки (ЗЦМ), изолят соевого белка), которые использовали для имитации фальсификации молока-сырья. Характеристика объектов исследований приведена в табл. 1.

Таблица 1  
Характеристика объектов исследования

Продукт	Органолептические характеристики		Массовая доля белка, %
	внешний вид и консистенция	цвет	
Молоко-сырье кислотностью 18°Т – базовый образец	Однородная жидкость без осадка и хлопьев	Белый	3,0
Сыворотка ДМ	Мелкодисперсный порошок без комочков	Белый с легким кремовым оттенком	11,0
ЗЦМ	Сухая смесь в виде мелкодисперсного порошка	Белый с кремовым оттенком	22,0
Изолят соевого белка	Мелкодисперсный порошок	Кремовый	90,0

*Примечания:* 1. Определение кислотности молока-сырья проводили в соответствии с ГОСТ 3624–92 [4].

2. Определение массовой доли белка в молоко-сырье проводили в соответствии с ГОСТ 23327–98 [5].

3. Массовая доля белка белоксодержащих компонентов указана согласно маркировке производителя.

Для подготовки модельных образцов использовали базовый образец молока-сырья в количестве 10 г. Массовую долю белка в модельных образцах рассчитывали на основе массовой доли белка в базовом образце молока-сырья (3,0%) с шагом 0,3%, не допуская выхода значения за границы естественного содержания белка (от 2,8 до 4,0% [6]). Описанный подход способствовал созданию трех видов модельных образцов с массовыми долями 3,3; 3,6 и 3,9%.

Расчет количества белоксодержащего компонента для имитации фальсификации молока-сырья проводили следующим образом. Для оп-

ределения массовой доли белка в модельном образце воспользовались формулой (1):

$$w_{б/мод} = \frac{m_{мол} \times w_{б/мол} + m_{бк} \times w_{б/бк}}{m_{мол} + m_{бк}}, \quad (1)$$

где  $w_{б/мод}$  – массовая доля белка в модельном образце;  $m_{мол}$  – масса базового образца молока-сырья, г;  $w_{б/мол}$  – массовая доля белка в базовом образце молока-сырья;  $m_{бк}$  – масса белоксодержащего компонента, г;  $w_{б/бк}$  – массовая доля белка в белоксодержащем компоненте.

Расчет массы белоксодержащего компонента для имитации фальсификации молока-сырья проводили по формуле (2):

$$m_{бк} = \frac{m_{мол} (w_{б/мод} - w_{б/мол})}{w_{б/бк} - w_{б/мол}}. \quad (2)$$

Сформировали три группы модельных образцов. Модельные образцы первой группы (№ 1–3) содержат в качестве дополнительного белкового компонента сухую деминерализованную молочную сыворотку, второй группы (№ 4–6) – заменитель цельного молока, третьей группы (№ 7–9) – изолят соевого белка. Данные для подготовки модельных образцов представлены в табл. 2.

Таблица 2  
Подготовка модельных образцов

№ образца	Массовая доля белка в модельном образце, %	Масса белоксодержащего компонента, г
1	3,3	0,390
2	3,6	0,811
3	3,9	1,268
4	3,3	0,160
5	3,6	0,326
6	3,9	0,497
7	3,3	0,035
8	3,6	0,069
9	3,9	0,105

В основу проведения исследований положена методика идентификации фракционного состава белков молока методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-электрофореза) [7]. ДСН-электрофорез позволяет фракционировать белки в зависимости от значений только одного параметра – их молекулярной массы. Белки связывают додецилсульфат натрия за счет гидрофобных взаимодействий в теоретическом соотношении 1,4 г ДСН на 1 г белка. Каждая молекула ДСН несет отрицательный заряд, и огромный избыток их превосходит собственный суммарный заряд белка. Соотношение

размер/заряд в присутствии ДСН становится практически одинаковым для любого белка, и деление происходит по молекулярной массе, так как поры геля работают как молекулярные сита [8].

Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза с использованием 12%-ного акриламидного геля. Исследуемые образцы перед проведением разделения в камере денатурировали при температуре 100°C с добавлением смеси, содержащей ДСН и β-меркаптоэтанол. В качестве электродного буфера использовали 0,05 М ТРИС-глициновый буфер с 0,01% ДСН. Напряжение при проведении разделения постепенно увеличивали в диапазоне от 100 до 200 В. Продолжительность разделения составила около 5 ч.

После окончания разделения в камере гель извлекли и проводили фиксацию белков 30%-ным раствором уксусной кислоты. Окрашивание полученного геля выполняли с использованием спиртового раствора красителя кумасси бриллиантового голубого с добавлением кислоты уксусной ледяной. Отмывку геля проводили 10%-ным раствором уксусной кислоты.

Порядок проведения экспериментальных исследований по подготовке модельных образцов для выявления фальсификации молока-сырья по белковому составу методом ДСН-электрофореза показан в табл. 3.

Таблица 3

**Этапы экспериментальных исследований по подготовке модельных образцов для выявления фальсификации молока-сырья по белковому составу методом ДСН-электрофореза**

1. Определение массовой доли белка в базовом образце молока-сырья		
2. Проведение расчетов и подготовка модельных образцов молока-сырья		
2.1. Добавление сыворотки ДМ	2.2. Добавление ЗЦМ	2.3. Добавление изолята соевого белка
3. Проведение ДСН-электрофореза базового и модельных образцов молока сырья		

*Результаты исследования.*

Результаты исследования модельных образцов методом ДСН-электрофореза представлены на рис. 1.

Проведем анализ полученных результатов исследования модельных образцов методом ДСН-электрофореза.

Дорожки № 1–3 модельных образцов первой группы, содержащих сыворотку ДМ, имеют более широкие полосы сывороточных белков по сравнению с базовым образцом. При проведении визуальной оценки и сравне-

ния внутри группы образцов четко видна закономерность: по мере увеличения массовой доли белка с шагом 0,3% от образца № 1 к образцу № 3 происходит увеличение ширины полос сывороточных белков.

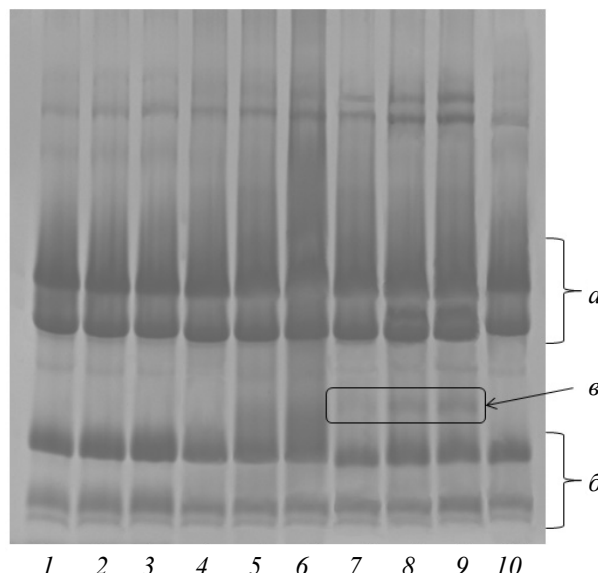


Рис. 1. ДСН-электрофорез модельных образцов молока-сырья:

- a* – казеиновые белки; *б* – основные сывороточные белки; *в* – соевый белок;
- 1–9 – модельные образцы молока-сырья;
- 10 – базовый образец молока-сырья

При проведении анализа дорожек модельных образцов № 4–6, содержащих ЗЦМ, прослеживается аналогичная первой группе закономерность. При увеличении количества внесенного дополнительно белоксодержащего компонента увеличивается ширина полос сывороточных белков. Разница 0,3% в значении массовой доли белка для образцов № 4–6 хорошо заметна по ширине полос на каждой из полученных электрофореграмм. Однако следует отметить размытость дорожек модельных образцов второй группы по сравнению с дорожками других групп и базового образца. Причиной может быть, согласно данным [9], присутствие дополнительных жиров растительного происхождения в ЗЦМ, о чем имеется указание в маркировке производителя.

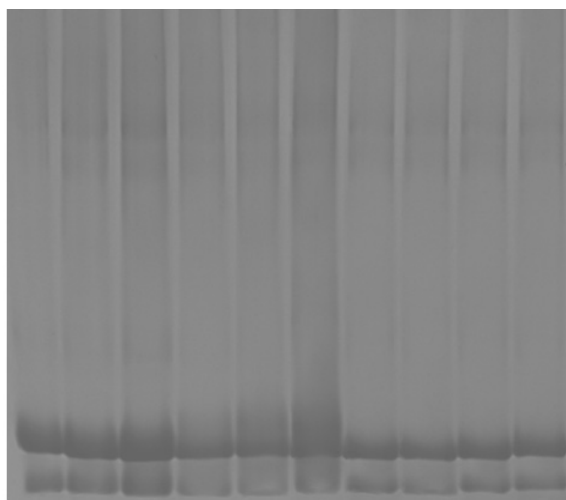
Модельные образцы третьей группы отличаются от двух первых присутствием белоксодержащего компонента немолочного происхождения. Особенностью дорожек модельных образцов № 7–9 по сравнению с базовым образцом и образцами двух остальных групп является появление дополнительной полосы в интервале между сывороточными и казеиновыми белками, что отражено на первой электрофореграмме. При этом наблюдается увеличение ширины

описанной дополнительной полосы от образца № 7 к образцу № 9, что обусловлено соответствующим увеличением массовой доли белка на 0,3% внутри группы.

Особенностью полученной электрофореграммы являются более широкие полосы казеина в сравнении с сывороточными белками. Указанная особенность обусловлена значительным процентным содержанием казеина по сравнению с сывороточными белками (содержание казеина колеблется от 2,1 до 2,9%, сывороточных белков – 0,6%) [9].

Для определения возможности устранения описанной особенности полученной электрофореграммы был проведен дополнительный анализ методом ДСН-электрофореза модельных образцов. Отличительной чертой анализа являлось предварительное осаждение казеиновой фракции белков путем подкисления образцов разбавленным раствором соляной кислоты до достижения pH 4,6. Полученный осадок отфильтровывали и проводили анализ фильтрата.

Результаты исследования модельных образцов после осаждения казеиновой фракции методом ДСН-электрофореза представлены на рис. 2.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Рис. 2. ДСН-электрофорез модельных образцов молока-сырья после осаждения казеиновой фракции:

1–9 – модельные образцы молока-сырья;

10 – базовый образец молока-сырья

При сравнении двух полученных электрофореграмм следует отметить, что предварительное осаждение казеиновой фракции белков позволяет получить более четкое изображение

сывороточных белков. Закономерности, описанные выше для первой и второй групп модельных образцов по результатам анализа первой электрофореграммы (рис. 1), прослеживаются на второй электрофореграмме (рис. 2), полученной после предварительного осаждения казеиновой фракции. При проведении анализа дорожек № 7–9 третьей группы модельных образцов на второй электрофореграмме следует отметить отсутствие характерных дополнительных полос соевого белка, что обусловлено осаждением растительных белков совместно с казеиновой фракцией. Таким образом, описанный прием по предварительному осаждению казеиновой фракции в модельных образцах эффективен при определении присутствия белоксодержащих компонентов молочного происхождения, однако его применение при определении наличия белоксодержащих компонентов растительного происхождения не является результативным, так как приводит к получению недостоверных результатов.

**Заключение.** Проведенные экспериментальные исследования подготовленных модельных образцов молока-сырья методом ДСН-электрофореза позволяют сделать следующие выводы.

1. Подготовленные модельные образцы с белоксодержащими компонентами молочного происхождения (сыворотка ДМ, ЗЦМ) имеют четкие различия в ширине полос сывороточных белков по сравнению с базовым образцом. При этом для каждой группы наблюдается следующая закономерность: по мере увеличения массовой доли белка внутри группы с шагом 0,3% происходит соответствующее увеличение ширины полосы сывороточных белков

2. Модельные образцы, в состав которых входит белоксодержащий компонент растительного происхождения (изолят соевого белка), имеют характерные дополнительные полосы на электрофореграмме. Соответствующее увеличение количества добавленного компонента приводит к увеличению ширины характерной дополнительной полосы.

Таким образом, разработанные модельные образцы применимы в качестве образцов сравнения при проведении идентификации белкового состава молока-сырья методом денатурирующего электрофореза с целью выявления его фальсификации. Использование подготовленных образцов дает возможность прогнозирования количества дополнительно внесенного белоксодержащего компонента.

### Литература

1. Твердохлеб Г. В., Раманаскас Р. И. Химия и физика молока и молочных продуктов. М.: ДеЛи принт, 2006. 360 с.
2. Абдуллаева Л. В. О дополнительных показателях качества сырого молока // Переработка молока. 2015. № 3. С. 18–19.

3. Идентификация во имя качества и безопасности // Продукт. ВУ. 2017. № 6. С. 20–21.
4. Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка: ГОСТ 23327-98. Введ. 01.03.00. М.: Стандартиформ, 2009. 12 с.
5. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности: ГОСТ 3624-92. Введ. 01.01.94. М.: Стандартиформ, 2009. 12 с.
6. Горбатова К. К. Химия и физика белков молока. М.: Колос, 1993. 192 с.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование: практ. пособие. М.: Наука, 1981. 288 с.
8. Сова В. В., Кусайкин М. И. Выделение и очистка белков. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. 42 с.
9. Молоко и молочные продукты. Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле: ГОСТ 33528-2015. Введ. 01.07.16. М.: Стандартиформ, 2015. 14 с.

### References

1. Tverdokhle G. V., Ramanauskas R. I. *Khimiya i fizika moloka i molochnykh produktov* [Chemistry and physics of milk and dairy products]. Moscow, DeLi print Publ., 2006. 360 p.
2. Abdullaeva L. V. On additional indicators of the quality of raw milk. *Pererabotka moloka* [Processing of milk], 2015, no. 3, pp. 18–19 (In Russian).
3. Identification in the name of quality and safety. *Produkt. BY* [Product. BY], 2017. no. 6, pp. 20–21 (In Russian).
4. GOST 3624-92. Milk and dairy products. Titrimetric methods for determination of acidity. Moscow, Standartinform Publ., 2009. 12 p. (In Russian).
5. GOST 33528-2015. Milk and dairy products. Identification of protein composition by electrophoretic method in polyacrylamide gel. Moscow, Standartinform Publ., 2015. 14 p. (In Russian).
6. Gorbatova K. K. *Khimiya i fizika belkov moloka* [Chemistry and physics of milk proteins]. Moscow, Kolos Publ., 1993. 192 p.
7. Osterman L. A. *Metody issledovaniya belkov i nukleinykh kislot. Elektroforez i ul'tratsentrifugirovaniye* [Methods for studying proteins and nucleic acids. Electrophoresis and ultracentrifugation]. Moscow, Nauka Publ., 1981. 288 p.
8. Sovva V. V., Kusaykin M. I. *Vydeleniye i ochistka belkov* [Isolation and purification of proteins]. Vladivostok, Izd-vo Dal'nevost. un-ta Publ., 2006. 42 p.
9. GOST 23327-98. Milk and dairy products. Method for measuring the mass fraction of total nitrogen according to Kjeldahl and determining the mass fraction of protein. Moscow, Standartinform Publ., 2009. 12 p. (In Russian).

### Информация об авторах

**Шегидевич Екатерина Дмитриевна** – заведующая пищевым инновационным центром. РУП «Институт мясо-молочной промышленности» (220075, г. Минск, пр. Партизанский, 172, Республика Беларусь). E-mail: ek.sheg@yandex.ru

**Егорова Зинаида Евгеньевна** – кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры физико-химических методов сертификации продукции. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: egorovaze@tut.by

### Information about the authors

**Shegidevich Ekaterina Dmitrievna** – Head of the Food Innovation Center. RUE “Institute for Meat and Dairy Industry” (172, Partizansky Ave., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ek.sheg@yandex.ru

**Yegorova Zinaida Evgen'yevna** – PhD (Engineering), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Physical and Chemical Methods of Product Certification. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: egorovaze@tut.by

Поступила 03.11.2017