

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАЛЬСИФИКАЦИИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

The modern methods of milk and milk products adulteration are described in the article. The attention is paid on a new technique of adulteration, which includes vegetable protein adding to increase the total protein amount in milk. Some negative results of a such adulteration are shown. Good prospects of electrophoresis and chromatography for the mentioned adulteration detection are demonstrated.

Введение. Особое место в деле выработки высококачественной молочной продукции принадлежит повышению качества заготавливаемого молока. Как известно, ужесточение нормируемых показателей сырья обуславливает повышение качества производимой продукции. Поэтому новые белорусские требования при закупках коровьего молока направлены в том числе и на стимулирование поставок высокосортного молока. В соответствии с этим предусмотрен контроль содержания белка в молоке.

Вместе с тем появляется также возможность нового вида фальсификации молока – повышение содержания белка в молоке путем добавления в него растительного белка. Наиболее доступным для этих целей является соевый белок, поскольку в нем оптимальное соотношение аминокислот, наиболее близкое к животному белку. Для сравнения рассмотрим аминокислотный состав соевого и молочного белков (см. таблицу) [1, 2].

Таблица
Аминокислотный состав белков
молока и сои

Аминокислота	Белки молока, %	Соевый белок, %
Цистин	1–6	1,3–1,4
Гистидин	2–5	2,6–2,7
Лизин	9–24	6,3–6,4
Триптофан	1–4	1,3
Фенилаланин	4–9	5,1–5,2
Фетионин	1–6	1,2–1,3
Треонин	7–15	3,8–4,4
Лейцин	8–22	7,8–8,2
Изолейцин	8–13	4,8–4,9
Валин	6–19	4,9–5,0

Однако применение соевого белка в молоке-сырье для повышения содержания белка не может полностью заменить животные белки молока, поскольку, как и во всех бобах, в сое низкое содержание серосодержащих аминокислот цистина и метионина, хотя в некоторых литературных источниках приводятся данные об отсутствии метионина и цистина. Кроме того, применение современных технологий переработки приводит к разрушению лизина.

Содержащееся в соевых продуктах вещество, напоминающее витамин В₁₂, не может усваиваться человеческим организмом; напротив, употребление соевых продуктов может привести к нехватке витамина В₁₂.

В соевых продуктах содержатся ингибиторы трипсина, которые препятствуют усвоению белков и влияют на функционирование поджелудочной железы. В ходе опытов на животных выяснилось, что диеты, содержащие большое количество ингибиторов трипсина, приводят к замедлению роста и расстройствам поджелудочной железы. Употребление соевых продуктов приводит к увеличению потребности организма в витамине D, который необходим для укрепления костных тканей и нормального роста. Содержащаяся в соевых продуктах фитиновая кислота препятствует усвоению железа и цинка, которые необходимы для обеспечения здорового состояния и развития мозга и нервной системы. Кроме того, в сое отсутствует холестерин, который также необходим для развития мозга и нервной системы. Огромное количество фитоэстрогенов, содержащихся в искусственных смесях на основе сои, является причиной наблюдающейся в настоящее время тенденции к преждевременному половому созреванию девочек и замедленному или слишком позднему половому созреванию мальчиков.

Употребление соевых продуктов может приводить к дефициту кальция и витамина D, которые необходимы для формирования здоровых костных тканей [3].

Основная часть. Белки как основной питательный компонент входят в состав микробиологических сред и практически всех пищевых продуктов. Использование белка животного происхождения с добавками растительных, например соевых, белков требует проведения идентификации белковых рецептур и прогнозирования экологической безопасности продуктов на их основе.

Эта проблема становится особенно актуальной в связи с возрастанием требований к анализу качества веществ, обладающих питательной ценностью. Возможности фальсификации белковых композиций, а также общие требования к созданию унифицированных методов контроля качества вызывают необходимость создания простых аналитических методов для

использования в биохимическом анализе веществ пищевого назначения.

Для анализа белка применяются такие методы, как спектрофотометрия, электрофорез, гистологические, генетические методы, а также метод ферментативного иммунного анализа и хроматография (ВЭЖХ, ИОХ), однако результаты, полученные данными методами, достаточно противоречивы и, как правило, не могут быть однозначно интерпретированы.

В литературе имеются данные о том, что физико-химический анализ позволяет определять содержание белка от 1 до 50% в смеси с родственными белками, однако четкое количественное разделение белка на животный и растительный не всегда может быть успешно осуществлено. В современной литературе практически отсутствуют данные о сопоставительном количественном анализе белков различной видовой специфичности, которые содержатся в большинстве пищевых продуктов, потребляемых человеком [4].

Поэтому целью исследований на данном этапе является определение содержания растительного белка в смеси с животным, в частности в молоке.

Для определения растительного белка в молоке предполагается использовать метод электрофореза.

Разделять смеси белков посредством электрофореза начали еще в начале XX в. Этот метод является достаточно точным и не требует большого количества анализируемого образца, достигается наиболее полное разделение на компоненты.

Принцип электрофореза белков состоит в том, что молекула белка в растворе при любом значении pH, отличающемся от ее изоэлектрической точки, имеет некий средний целочисленный заряд. Это и приводит к тому, что белок движется в электрическом поле [5].

За последнее время электрофоретический метод фракционирования белков претерпел существенные изменения и значительно усовершенствовался. Это касается поддерживающих сред для электрофореза, буферных систем, реагентов для обнаружения белковых фракций на электрофореграммах и аппаратуры, а также создания градиента концентрации некоторых поддерживающих сред и градиента pH. Все это упрощает анализ, дает возможность выбора [6].

По имеющимся литературным данным [4, 7], для указанных целей широко применяется электрофорез в полиакриламидном геле и в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. При работе с додецилсульфатом натрия можно подвергать электрофоретическому разделению смеси любых белков растительного или животного происхождения [7]. Принимая во внимание [4], можно отметить, что при экс-

тракции анализируемых образцов 0,1М трибуфером pH 9 в растворе определяется большее количество белковых фракций, чем при экстракции фосфатными буферами. Кроме того, данные электрофореза экстрактов, полученных при низких температурах (8°C), позволяют определить примесные белки животного происхождения в растительных продуктах, но не наоборот. Поэтому для обнаружения примеси растительных белков необходимы условия выделения, при которых максимально экстрагируются растительные белки, а степень экстракции животных белков минимальна, т. е. необходима высокотемпературная экстракция. Еще оказалось, что для белков животного происхождения характерно наличие большого количества фракций с молекулярной массой в области 12–150 кДа, а для растительных белков – в области менее 12 кДа. Однако эти данные относятся к мясным продуктам, и степень их применимости к молоку еще предстоит уточнить.

Кроме того, используя метод капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия, можно определить содержание соевых и гороховых белков в сухом молоке [8].

Кроме описанного вида фальсификации молока растительным белком, существуют и другие способы фальсификации. Рассмотрим кратко известные и перспективные методы контроля качества молока-сырья и молочных продуктов.

Во многих странах мира для оперативного анализа показателей качества молочной продукции широко применяется метод спектроскопии в ближней инфракрасной области.

ИК-анализатор позволяет быстро получать данные о составе образца, тем самым сократить расходы по производственному контролю, повысить качество продукции и достичь снижения ее себестоимости. Проведение анализа не требует применения дорогостоящих расходных материалов и химических реактивов, а также привлечения персонала высокой степени подготовки [9].

Использование ИК-спектроскопии является перспективным направлением при определении содержания белка, жира, лактозы и других компонентов в молоке и молочных продуктах. Использование прибора экспресс-анализатора позволяет получать количественную информацию об основных компонентах молока за очень короткий промежуток времени (90 с). Принцип действия анализатора основан на измерении интенсивности ИК-излучения, прошедшего через кювету с исследуемым образцом молока. Как правило, на завод от сдатчиков поступает молоко с содержанием жира от 3,4 до 4,3%, белка – от 2,7 до 3,4%, лактозы – от 4 до 8,4%. Диапазон значений достаточно небольшой, и это позволяет откалибровать прибор таким образом, что абсолютная погрешность определения массовой доли жира снижается до 0,03–0,07%, а массовой доли белка –

до 0,04–0,08%. Это очень важно и для производителей молочной продукции, и для поставщиков молока, поскольку связано с получением для первых высококачественной продукции, а для вторых – дополнительной прибыли [10].

С помощью гель-проникающей жидкостной хроматографии возможно определение фальсификации сухого молока путем добавления в него подсырной сыворотки. Величина добавки колеблется в пределах от 10 до 60%, наиболее распространена замена 1/3 молочной части. Обнаружение этого вида фальсификации основано на том, что в сыром коровьем молоке содержание казеина составляет $(75 \pm 3)\%$ от общего белка, а альбуминов (сывороточных белков) – $(25 \pm 3)\%$, т. е. нормальное соотношение казеин : альбумин в молоке составляет 3 : 1. Гель-проникающая хроматография позволяет также определить наличие в твороге соевого белка по различию в аминокислотном составе (маркер – метионин) [11].

При анализе аминокислот в продуктах питания не только качественно, но и количественно возможно применение тонкослойной хроматографии. Применение этого метода не требует сложного оборудования, к тому же он обладает высокой избирательностью и чувствительностью. С его помощью можно определить 10–20 мкг вещества с точностью до 5–7% [12].

Для получения данных о триглицеридном составе жиров используют методы классической колоночной жидкостной хроматографии с отбором 15–20 фракций в течение нескольких часов или метод эксклюзионной жидкостной хроматографии. Существенно сократить время анализа позволяет микроколоночная обращенно-фазовая ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектором. Этот метод позволяет за 10–15 мин без существенной пробоподготовки выполнить анализ на хроматографе «Милихром-5».

Молочный жир в отличие от растительных масел включает в себя большое количество низкомолекулярных триглицеридов, содержащих наряду с основными кислотами минорные жирные кислоты, что приводит к размыванию пиков, характеризующих триглицеридный фракционный состав. Кроме того, установлено, что молочный жир имеет более сложное фракционное распределение, чем описанное ранее.

В обращенно-фазовой ВЭЖХ удерживание триглицеридов закономерно повышается по мере роста длины углеродных цепей жирнокислотных фрагментов. Длинноцепочные триглицериды прочно удерживаются в привитой октадецильной «щетка» сорбента. Наличие двойных связей облегчает вымывание жиров, поэтому триглицериды с ненасыщенными кислотами вымываются из колонки быстрее, чем их насыщенные аналоги.

Несмотря на пониженную селективность разделения, различия в соотношении пиков, т. е. профили хроматограмм, весьма характерны для многих типичных жиров, что позволяет по банку хроматографических данных проводить их качественную идентификацию.

Микроколоночная ВЭЖХ позволяет выявить грубую фальсификацию молочного жира, различить молочный жир, полученный в разные сезоны, в зависимости от рациона кормления и породы коров.

В отличие от газовой хроматографии этот метод дает возможность изучать нативное состояние молочного жира, что важно при селекции крупного рогатого скота, при выявлении заболеваний вымени коровы (маститы).

Для спредов, в которых отсутствует молочный жир и жиры лауриновой группы, в области удерживания низкомолекулярных триглицеридов пики отсутствуют, в то же время основные пики из-за бедности жирнокислотного состава более узкие и более интенсивные. Это связано с более сильным поглощением в УФ-области полиненасыщенных кислот, содержание которых в растительных жирах выше по сравнению с молочным жиром.

Применение поливолнового режима позволяет контролировать одновременно с триглицеридами наличие соединений нелипидного происхождения. При 254–270 нм можно зафиксировать жирорастворимые витамины, антиоксиданты фенольного типа, синтетические и натуральные колоранты, консерванты и т. п. [13].

Закключение. Таким образом, применение микроколоночной ВЭЖХ с УФ-детектированием перспективно для качественного контроля триглицеридного состава молочного жира, его заменителей, для контроля аутентичности жировой продукции и наличия в ней добавок антиоксидантов и биологически активных добавок.

Кроме того, возможно определение растительных белков в молоке методом электрофореза. В то же время нет данных по определению растительных белков именно в молоке-сырье и других молочных продуктах, кроме сухого молока.

Поэтому на следующих этапах работы предстоит определить пригодность описанных методов для обнаружения растительного белка в молоке и молочных продуктах, а также рассмотреть другие разновидности электрофореза (например, более простой и быстрый метод электрофореза на бумаге).

Литература

1. Горбатова, К. К. Химия и физика молока: учебник для вузов / К. К. Горбатова. – СПб.: ГИОРД, 2003. – 288 с.

2. Зобкова, З. С. Пищевые добавки и функциональные ингредиенты / З. С. Зобкова // Молочная пром-сть. – 2007. – № 10 – С. 6–12.
3. Электронный ресурс. Режим доступа: www.WestonAPrice.org. – Дата доступа: 29.01.2008.
4. Экологическая безопасность продовольственного сырья. Идентификация животного и растительного белка в питательных композициях / А. Н. Иванкин [и др.] // Экологические системы и приборы. – 2003. – № 10. – С. 38–41.
5. Скуопс, Р. Методы очистки белков: пер. с англ. / Р. Скуопс. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
6. Филипович, Ю. Б. Биохимия белка и нуклеиновых кислот: учеб. пособие для студентов пед. ин-тов по хим. и биол. спец. / Ю. Б. Филипович. – М.: Просвещение, 1978. – 192 с.
7. Практикум по физико-химическим методам в биологии: практ. пособие / под ред. д-ра биол. наук Ф. Ф. Литвина. – М.: Изд-во МГУ, 1981. – 240 с.
8. ИСО 17129:2006. Молоко сухое. Определение содержания соевых и гороховых белков методом капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия. Скрининговый метод. – Введ. 01.07.2006. – Издан 01.11.2006.
9. Хлыстун, О. В. Современный метод инфракрасного анализа молочной продукции / О. В. Хлыстун // Молочная пром-сть. – 2007. – № 2. – С. 34–35.
10. Анисимов, С. В. Использование метода инфракрасной спектроскопии в работе приемной лаборатории / С. В. Анисимов, Т. И. Герасюта // Молочная пром-сть. – 2007. – № 2. – С. 36–37.
11. Коваленко, Д. Н. Лаборатория против фальсификаций: молоко и молочное сырье / Д. Н. Коваленко // Молочная пром-сть. – 2007. – № 1. – С. 56–58
12. Контроль фенилаланина в молочных продуктах и способ его удаления / Л. А. Остроумов [и др.] // Молочная пром-сть. – 2007. – № 9. – С. 71–72.
13. Экспресс-анализ триглицеридов методом микроколоночной ВЭЖХ с УФ-детектором / С. А. Востроилов [и др.] // Молочная пром-сть. – 2007. – № 2. – С. 38–39.