



Oznaczanie zafałszowań tłuszczu mlekowego w produktach mleczarskich

Ryszard Rafałowski*, Joanna Klepacka, Beata Paszczyk

Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko–Mazurski w Olsztynie

*kontakt e–mail: rych@uwm.edu.pl

Tłuszcz mlekowy

Mleko i jego przetwory są źródłem wielu składników pokarmowych, takich jak np. białko, tłuszcz, węglowodany, witaminy czy sole mineralne, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Tłuszcz mlekowy posiada właściwości prozdrowotne, np. zawiera kwas masłowy C4:0, który zapobiega nowotworom jelita grubego, jak również inne kwasy tłuszczowe C6:0–C12:0 wykazujące działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne. Stanowią one także łatwo dostępne źródło energii [1]. Tłuszcz mlekowy charakteryzuje się szerokim zakresem zmian składu chemicznego, ponieważ zależą one m.in. od sposobu żywienia krów i stosowanych dawek pokarmowych. Istotny jest też system chowu zwierząt: wolnostanowiskowy, pastwiskowy z wybiegiem, cechy osobnicze i rasa krów, ich stan zdrowotny, wiek, warunki bytowania czy okres laktacji. [1,3,5]. Typowy skład i wyróżniki tłuszczu mlekowego przedstawiono w tabeli 1 i 2 .

Ze względu na swe unikalne właściwości tłuszcz mlekowy znajduje szerokie zastosowanie w gastronomii np. podczas produkcji lodów, ciast i innych deserów. Jest on jednym z najdroższych tłuszczów na rynku, dlatego też wykrywanie obcych lipidów jest bardzo ważne ze względu na możliwość fałszowania masła. Początkowo wykrywanie dodatku tańszych lipidów naturalnych do tłuszczu mlekowego miało na celu ochronę konsumenta przed zafałszowaniami. Nieco później potrzeba wykrywania i ilościowego oznaczania dodatku tłuszczów obcych wynikała z potrzeby kontroli przestrzegania receptur technologicznych, coraz szerzej wprowadzanych na rynek produktów masłopodobnych. Zatajona zamiana tłuszczu mlekowego na tańsze lipidy pochodzenia roślinnego narusza nie tylko interes ekonomiczny ale może też wpływać negatywnie na zdrowie konsumentów [8].



Tabela 1. Typowy skład tłuszczu mlekowego i jego wyróżniki.
Opracowanie własne na podstawie [1,3,5].

| Składnik/wyróżnik | Przeciętny zakres |
|-------------------------------------|-------------------|
| TŁUSZCZE PROSTE | |
| Triacyloglicerole (%) | 96 – 99 |
| Diacyloglicerole (%) | 0,3 – 1,6 |
| Monoacyloglicerole (%) | 0,002 – 0,1 |
| POCHODNE LIPIDÓW | |
| Wolne kwasy tłuszczowe(%) | 0,1 – 0,4 |
| TŁUSZCZE ZŁOŻONE | |
| Fosfolipidy (%) | 0,2 – 1,0 |
| Glikosfingolipidy (%) | 0,01 – 0,07 |
| SKŁADNIKI TOWARZYSZĄCE | |
| Cholesterol (µg/g tł) | 0,2 – 0,4 |
| Karotenoidy (µg/g tł) | 6 – 10 |
| Witamina A (µg/g tł) | 6 – 20 |
| Witamina D (µg/g tł) | 0,04 – 0,50 |
| Witamina E (µg/g tł) | 5 – 50 |
| Witamina K (µg/g tł) | 0,07 – 0,10 |
| Wyróżniki tłuszczu mlekowego | |
| Liczba zmydlania | 220 – 236 |
| Liczba jodowa | 28,0 – 39,6 |
| Liczba Polenskego | 1,5 – 3,5 |
| Liczba Richerta–Maisla | 24 – 32 |
| Współczynnik refrakcji (40°C) | 1,4533 – 1,4546 |
| Gęstość (g/cm ³) | 0,9109 – 0,9026 |

Tabela 2. Typowy skład triacylogliceroli i głównych kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka.
Opracowanie własne na podstawie [1,3,5].

| Kwasy tłuszczowe (nazwa zwyczajowa) udział procentowy | | Triacyloglicerole udział procentowy | |
|---|-------------|--|-------------|
| C4:0 masłowy | 2,9 – 3,1 | C26 | 0,1 – 1,0 |
| C6:0 kapronowy | 2,0 – 2,1 | C28 | 0,3 – 1,3 |
| C8:0 kaprylowy | 1,1 – 1,3 | C30 | 0,7 – 1,5 |
| C10:0 kaprynowy | 3,5 – 3,7 | C32 | 1,8 – 4,0 |
| C12:0 laurynowy | 3,7 – 4,0 | C34 | 4,0 – 8,0 |
| C14:0 mirystynowy | 11,6– 14,5 | C36 | 9,0 – 14,0 |
| C16:0 palmitynowy | 23,8 – 31,1 | C38 | 10,0 – 15,0 |
| C18:0 stearynowy | 7,7 – 11,1 | C40 | 9,0 – 13,0 |
| C14:1 mirystooleinowy | 1,3 – 2,6 | C42 | 6,0 – 7,0 |
| C16:1 palmitooleinowy | 3,7 – 4,7 | C44 | 5,0 – 7,5 |
| C18:1 oleinowy | 17,2 – 21,5 | C46 | 5,0 – 7,0 |
| C18:2 linolowy | 1,1 – 1,3 | C48 | 7,0 – 11,0 |
| C18: linolowy sprzężony | 0,4 – 1,4 | C50 | 8,0 – 12,0 |
| C18:3 linolenowy | 0,7 – 1,1 | C52 | 7,0 – 11,0 |
| | | C54 | 1,0 – 5,0 |

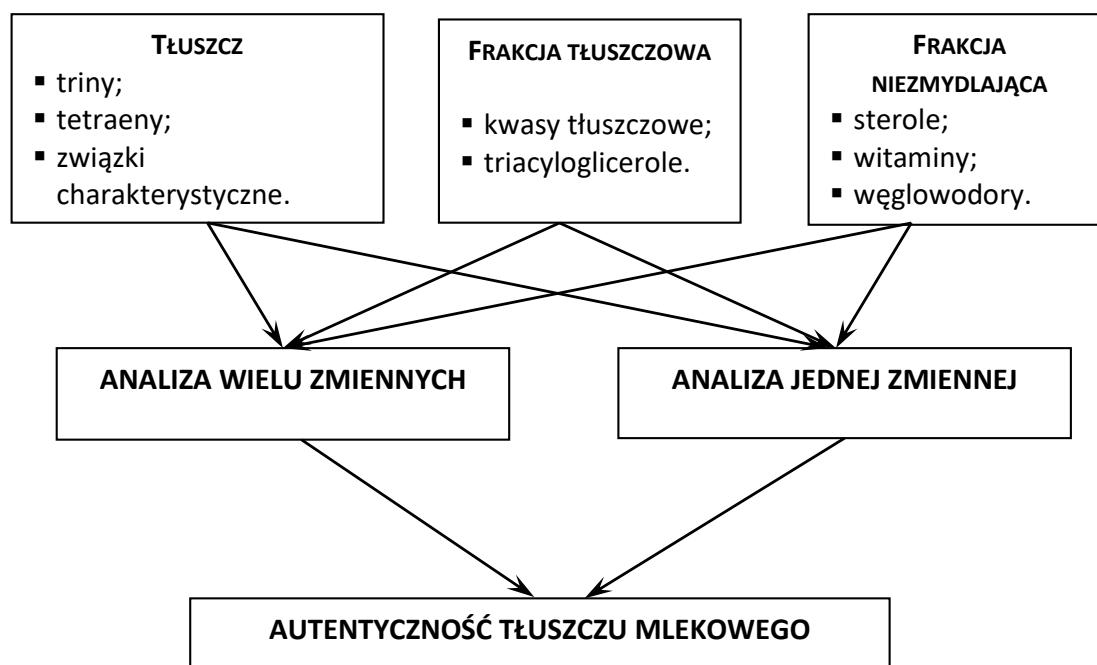


Zafałszowania tłuszczu mlekowego i ich wykrywanie

Metody stosowane do wykrywania dodatku obcych tłuszczów do tłuszczu mlekowego zostały podzielone na kilka grup obejmujących:

- wykrywanie obecności specyficznych substancji zafałszowujących;
- oznaczanie wybranych stałych fizycznych;
- określanie składu triacylogliceroli;
- wyznaczanie jakościowego i ilościowego składu kwasów tłuszczowych;
- określanie jakościowego i ilościowego składu substancji niezmydlających się [4,5,6,8,9].

Warunkiem wstępnym doboru odpowiedniej metody analitycznej jest znajomość składu tłuszczu mlekowego i ewentualnych tłuszczów dodanych. Istotną kwestią jest rozeznanie naturalnych granic zmienności składu tłuszczu, tj. składu substancji niezmydlających się, składu kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli [8,9] (rys. 1).

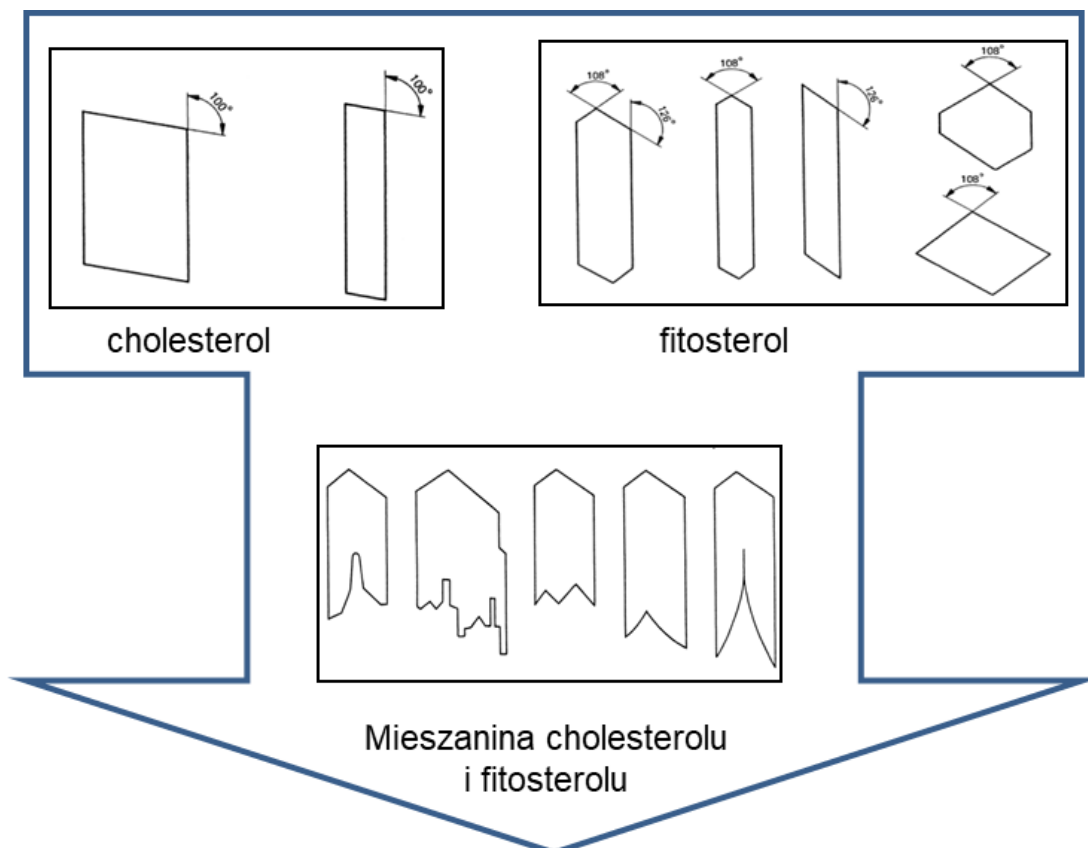


Rysunek 1. Schemat badań zafałszowań tłuszczu mlekowego. Opracowanie własne na podstawie [8].

Najstarsze metody wykrywania dodatku obcych tłuszczów do tłuszczu mlekowego polegają na oznaczaniu liczb tłuszczowych: Reicherta-Meisla (LRM), Polenskego (LP), zmydlenia (LZ), estrowej, jodowej (LJ), gęstości, współczynnika refrakcji [5,8,9].

Skuteczną metodą do wykrywania zafałszowań jest też procedura zawarta w normie PN-ISO 3595:2000, która opisuje referencyjną metodykę wykrywania tłuszczu roślinnego w tłuszczu mlecznym z użyciem testu octanowo-fitosterolowego. Zasada metody polega na zmydleniu tłuszczu i strąceniu steroli w postaci digitonianów steroli przez dodanie etanolowego roztworu digitoniny, oznaczanie temperatury topnienia octanu sterolu po uprzedniej acetylacji digitonianów steroli bezwodnikiem kwasu octowego i ewentualne badanie mikroskopowe krystalicznych form steroli powstałych w wyniku hydrolizy octanów sterolowych z użyciem roztworu wodorotlenku potasu. Jeżeli temperatura topnienia octanów steroli mieści się w zakresie od 114,0 do 115,5°C, to oznacza, że w badanej próbce nie występuje tłuszcz roślinny. Natomiast jeżeli temperatura topnienia octanów steroli wynosi 117,0°C lub powyżej to znaczy, że w badanej próbce występuje tłuszcz roślinny. Kryształy bada się pod

mikroskopem wtedy, gdy temperatura topnienia octanów steroli wynosi 115,5°C lub powyżej, ale nie przekracza 117°C. Obecność form charakterystycznych dla cholesterolu wskazuje, że w badanej próbce nie występuje tłuszcz roślinny. Obecność form charakterystycznych dla fitosteroli i mieszaniny fitosteroli i cholesterolu wskazuje, że w badanej próbce występuje tłuszcz roślinny [7], co pokazano na rys. 2. Metoda jest dokładna lecz bardzo czasochłonna i wymagająca sporej wprawy laboranta, zwłaszcza przy odczycie temperatury topnienia steroli.



Rysunek 2. Obrazy kryształów steroli. Opracowanie własne na podstawie [7].

Bardzo duże znaczenie w analizie lipidów ma chromatografia gazowa, wykorzystywana do oznaczania kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli czy też steroli. W celu wykrycia zafałszowania tłuszczu mlekowego na podstawie składu kwasów tłuszczowych stosuje się najczęściej wyróżniki jakościowe. Jednym z nich jest zawartość kwasu mirystynowego C14:0 charakterystyczna dla tłuszczu mlekowego, która wynosi w nim co najmniej 11%. Tłuszcze roślinne zawierają niewielkie ilości tego kwasu tłuszczowego, dlatego dodatek oleju roślinnego „rozcieńcza” zawartość kwasu C14:0 w tłuszczu mlekowym. Innym wyróżnikiem jest kwas wakcenyowy C18:1 11*trans* występujący na minimalnym poziomie 46% w składzie izomerów *trans* kwasów tłuszczowych mleka. Kolejnym wskaźnikiem zafałszowania tłuszczu mlekowego może być udział kwasu linolowego C18:2. Niezależnie od pory roku jego udział w składzie kwasów tłuszczowych powinien kształtować się poniżej 1,9%, a przekroczenie limitu 1,9% udziału tego kwasu w tłuszczu mlekowym może świadczyć o dodatku olejów roślinnych [8,9].

Metodą chromatografii gazowej można też oznaczać zafałszowanie tłuszczem roślinnym na podstawie ilościowego oznaczania steroli roślinnych, np. β -sitosterolu i stigmasterolu obecnego w tłuszczu mlekowym. Wzrost udziału dodanego oleju wpływa na obniżenie w uzyskanych mieszaninach zawartości cholesterolu i jednocześnie wzrost zawartości β -sitosterolu, stigmasterolu czy innego sterolu roślinnego [6,8,9].



Chromatografia cieczowa w analizie zafałszowań tłuszczu mlekowego znalazła zastosowanie przy analizie izomerów witaminy E i tokotrienoli. Podwyższona zawartość α - tokoferolu, obecność izomerów β -, γ -, δ -tokoferolu oraz tokotrienoli świadczy o dodatku olejów roślinnych do tłuszczu mlekowego [8,9].

Zwiększenie mocy obliczeniowej układów scalonych przyspieszyło rozwój badań dotyczących autentyczności tłuszczu mlekowego techniką chemometrii, która łączy metody analityczne oraz koncepcje statystyczne, informatyczne i matematyczne. Dane do analizy statystycznej otrzymuje się za pomocą dostępnych metod chemicznych, fizykochemicznych czy innych technik analitycznych, które polegają na analizie próbki produktu spożywczego przy użyciu określonej metody, np. spektroskopii masowej, chromatografii gazowej czy cieczowej [2,6,8,9,10,12,].

Jednym z wyników chemometrii jest np. równanie regresji wielorakiej pierwszego stopnia w ogólnej postaci:

$$X = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n$$

gdzie:

X - wartość graniczna przedziałów ufności S,

a_1 - parametr modelu,

x_1 - zawartość triacylogliceroli.

Metoda ta znalazła zastosowanie w Rozporządzeniu Komisji (WE) NR 273/2008 w odniesieniu do metod analizy oraz oceny jakości mleka i przetworów mlecznych jako metoda referencyjna oznaczania czystości tłuszczu mlecznego za pomocą gazowo-chromatograficznej analizy triglicerydów. Zasada metody polega na ekstrakcji tłuszczu z mleka lub przetworów mlecznych, który jest następnie poddawany analizie na kolumnie chromatograficznej. Do celów wykrywania tłuszczów obcych opracowane zostały wzory triacyloglicerodowe, z wartościami granicznymi przedziałów ufności S, gdzie wartości S czystych tłuszczów mleka mogą ulegać wahaniom. W przypadku, gdy te wartości graniczne zostaną przekroczone, można przyjąć że obecny jest tłuszcz obcy [11]. Technologiczna obróbka tłuszczu mlecznego, np. usuwanie cholesterolu lub frakcjonowanie, mogą spowodować uzyskanie fałszywie pozytywnego wyniku. Powyższe odnosi się również do tłuszczu mlecznego uzyskanego z mleka odtuszczonego lub maślanki. Omawiana metoda nie zawsze ma zastosowanie do tłuszczu wyekstrahowanego z sera, ponieważ proces dojrzewania może wywierać tak silny wpływ na skład tłuszczu, że uzyskany wynik jest fałszywie pozytywny [11].

Inną metodą pozwalającą na określenie zafałszowania tłuszczu jest chemometryczna analiza wyników otrzymanych podczas oznaczania składników tłuszczu mlekowego z zastosowaniem analizy składowych głównych PCA (ang. *Principal Component Analysis*). W metodzie tej na podstawie wielu zmiennych w nowo wytworzonym układzie współrzędnych łatwo jest wyodrębnić obszary występowania charakterystycznych grup lipidów, w tym z tłuszczem zafałszowanym. Tradycyjna analiza składu kwasów tłuszczowych nie pozwala na takie wnioskowanie [2,6,8,9,10,12]. Kolejnym krokiem w kierunku wykrywania zafałszowań tłuszczu mlekowego, według wielu autorów [2,10,12,13], będzie zastosowanie sieci neuronowych uczących się na wynikach analizy składu tłuszczu mlekowego i w konsekwencji powstanie sztucznej inteligencji w tym obszarze.

Podsumowanie

W pracy scharakteryzowano podstawowy skład tłuszczu mlekowego i jego wpływ na szacowanie zafałszowań. Biorąc pod uwagę sposób żywienia krów i wynikającą z tego zmienność składu tłuszczu mlekowego, analitycy stoją przed dużym wyzwaniem w zakresie wykrywania jego zafałszowań. W pracy przedstawiono prawnie uregulowane metody detekcji zafałszowań tłuszczu mlekowego: oznaczanie składu triacylogliceroli, steroli i digitonianów steroli. Wskazano na zastosowanie chemometrii w określaniu jakościowego i ilościowego dodatku obcych lipidów do



tłuszczu mlekowego. Określono również perspektywy rozwoju nowych, bardzo nowoczesnych metod służących do wykrywania zafałszowań tłuszczu mlekowego, co pozwala przypuszczać, że nieuczciwe praktyki jego fałszowania będą jeszcze bardziej skutecznie wykrywane i eliminowane.

Literatura

1. Cichosz G., Czeczot H., Bielecka K., (2020). The anticarcinogenic potential of milk fat. *Annals of Agricultural and Environmental, Medicine*, Vol 27, No 4, 512–518.
2. Grassi S., Tarapoulouzi M., D'Alessandro A., Agriopoulou S., Strani L., Varzakas T., (2023). How Chemometrics Can Fight Milk Adulteration, *Foods*, Vol 12, No 139, 1-28
3. Jensen R. G., (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000, *J. Dairy Sci.*, Vol 85, No 2, 295–350
4. Kumar A., (2015). Detection of vegetable oil and animal depot fat adulteration in anhydrous milk fat (ghee) using fatty acid composition, *MOJ Food Process. Technol.*, Vol 1, No 3, 1–8.
5. Kumar A., Upadhyay N., Gandhi K., Naik S.N., Sharma V., (2019). Detection of adulteration in anhydrous milk fat (ghee) using season variation in Butyro–refractometer reading studied by employing dry fractionation technique, *Indian J. Dairy Sci.* Vol 70, No 5, 563–570.
6. Nurseitova M. A., Amutova, F. B., Zhakupbekova, A. A., Omarova A. S., Kondybayev A. B., Bayandy G.A., Akhmetsadykov N.N., Faye B., Konuspayeva G.S., (2019). Comparative study of fatty acid and sterol profiles for the investigation of potential milk fat adulteration, *J. Dairy Sci.* No 102, 7723–7733.
7. PN–ISO 3595. (2000). Wykrywanie tłuszczu roślinnego z użyciem testu octanowo-fitosterolowego. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa
8. Rafałowski R., Klepacka J., Czarnowska M., Paszczyk B., Banul M., (2015). Oznaczanie tłuszczu obcego w tłuszczu mlekowym. Rozdz. 7 (w:) *Przeciwdziałanie patologiom na rynku żywności*. red. A. Lewkowicz i W. Pływaczewski, Wyd. Wyższej Szkoły Policji w Szczytnie, 89–102.
9. Rafałowski R., Klepacka J., (2017). Metody badania autentyczności tłuszczu mlekowego, *Prz. Mlecz.*, Nr 3, 12–17.
10. Rebechi S.R., Vélez M.A., Vaira S., Perotti M.C., (2016). Adulteration of Argentinean milk fats with animal fats: Detection by fatty acids analysis and multivariate regression techniques, *Food Chem.*, No 192, 1025–1032.
11. ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) (2013). NR 273/2008 z dnia 5 marca 2008 r. ustanawiające szczegółowe zasady stosowania rozporządzenia Rady (WE) nr 1255/1999 w odniesieniu do metod analizy oraz oceny jakości mleka i przetworów mlecznych, Wersja od: 1 lipca 2013 r.
12. Trbović D., Petronijević R., Đorđević V., (2017). Chromatography methods and chemometrics for determination of milk fat adulterants, *Earth Environ. Sci.*, Vol 85, 1–5.
13. Wawrzyniak J., Rudzińska M., Gawrysiak-Witulska M., Przybył K., (2022). Predictive Models of Phytosterol Degradation in Rapeseeds Stored in Bulk Based on Artificial Neural Networks and Response Surface Regression, *Molecules*, Vol 27, 2445.