

А.И. Василькевич, О.В. Дымар, д.т.н., проф.

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию,
Минск, Республика Беларусь*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ МОЛОКА

A. Vasilkevich, O. Dymar

*Scientific and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Republic of Belarus*

BIOLOGICAL FUNCTION OF MILK PHOSPHOLIPIDS AND THEIR ISOLATION APPROACHES

e-mail: vskalex@yandex.by, dymarov@tut.by

Особенность состава фосфолипидов молока по сравнению с другими природными источниками обеспечивает ряд ценных технологических и терапевтических свойств. В статье резюмированы известные возможности применения, выделения и анализа фосфолипидов из молока и дана их оценка с учетом собственного опыта исследований фосфолипидов. Наиболее целесообразным способом выделения фосфолипидов из молочного сырья являются методы микрофльтрации и ультрафльтрации. Полученный концентрат фосфолипидов может быть использован как эффективный эмульгатор с дополнительными биологически активными свойствами.

Milk phospholipids have different composition in comparison with other natural sources and provide a number of valuable technological and therapeutic properties. The article summarizes the well-known possibilities of using, isolating and analyzing phospholipids from milk. Their assessment is given taking into account own experience in studying phospholipids. The most appropriate way to isolate phospholipids from dairy raw materials include microfiltration and ultrafiltration methods. The resulting phospholipid concentrate can be used as an effective emulsifier with additional biologically active properties.

Ключевые слова: фосфолипиды молока; фосфатидилсерин; сфингомиелин; лецитин; эмульгатор.

Keywords: milk phospholipids; phosphatidylserine; sphingomyelin; lecithin; emulsifier.

Введение. Молоко считается источником большого количества ценных для человека нутриентов, таких как белок, жир и лактоза. Эти компоненты хорошо изучены и описаны, их значение и полезные свойства для питания известны. Однако в молоке присутствуют и менее изученные компоненты, роль и возможности применения которых еще до конца не понятны. Среди них класс соединений, известных под общим названием фосфолипиды, которые в молоке выполняют роль эмульгатора. Они образуют мембраны жировых шариков, обеспечивая условия для существования стабильной молочной эмульсии [1].

Фосфолипиды относятся к классу полярных липидов и состоят из остатков фосфорной кислоты, глицерина или сфингозина, жирных кислот и аминокислот. В природе они присутствуют в большом количестве в растительном масле, яичном желтке, рыбьем жире, мозге животных, молоке и др. [2]. Наиболее изученными и широко используемыми фосфолипидами являются соевые и яичные лецитины. Они широко применяются в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности в качестве эмульгаторов и стабилизаторов [2].

В молоке фосфолипиды содержатся в незначительном количестве (0,035% в цельном молоке) по сравнению с другими растительными и животными источниками, поэтому ранее молоко не рассматривали как источник фосфолипидов. Однако, последние исследования демонстрируют, что смеси фосфолипидов разного состава могут иметь широкий диапазон свойств, ценных для пищевой промышленности, начиная от новых продуктов функционального питания до липосомальных ингредиентов [3]. В этом обзоре обсуждается список возможностей, которые дают фосфолипиды молока, а также рассмотрено, какое биологическое значение они имеют для человека.

Материалы и методы исследований. В качестве материалов были использованы научные публикации зарубежных и отечественных авторов за последние 15 лет.

Результаты и их обсуждение. Фосфолипиды являются одними из важнейших компонентов биологических мембран. Их молекула имеет амфифильную структуру, т.е. состоит из неполярного хвоста (остаток жирной кислоты) и полярной головки (остаток фосфорной кислоты и аминокислоты). Благодаря этому в биологических двухфазных системах они способны переориентироваться таким образом, что полярная часть обращена в сторону полярной водной фазы, а неполярная часть обращена в сторону жировой фазы. Из-за этого свойства фосфолипиды способны эмульгировать жиры. В молоке они образуют комплекс с белками и холестерином (липопротеидный комплекс) и образуют оболочки, или иначе, мембраны жировых глобул молока (МЖГМ) [1]. Наличие фосфолипидов в составе МЖГМ и обеспечивает стабильность жировой эмульсии молока. Жировая глобула условно изображена на рисунке 1 [4, 5].

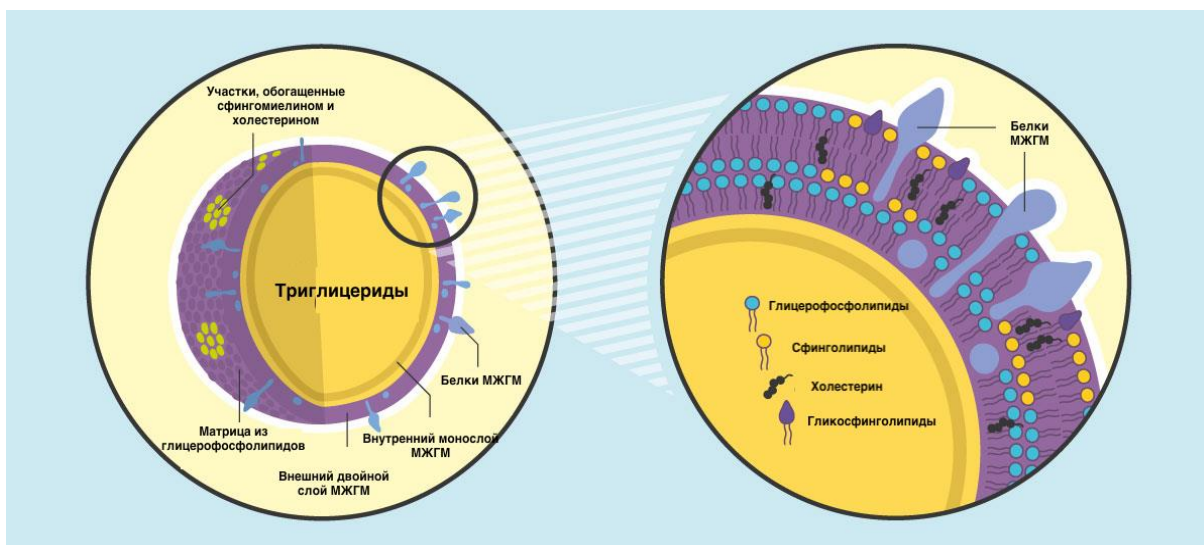


Рисунок 1 – Строение мембран жировых глобул молока

Источник данных: [4, 5]

Основная часть фосфолипидов молока (60–70%) входит в состав оболочек жировых шариков. Их количество в молочном жире вместе с гликолипидами составляет около 1%. Небольшая часть фосфолипидов находится в плазме молока в виде комплексов с белками [1]. Содержание фосфолипидов в различных молочных продуктах отличается, это зависит от типа используемой технологической переработки и содержания в исходном сырье. Так, при переработке молока с целью получения жира (например, при получении сливочного масла) с помощью технологических методов осуществляют разрыв МЖГМ, при этом фосфолипиды остаются в виде “обрывков” мембран, которые в дальнейшем сепарируют, получая

два продукта: сливочное масло и пахту. При гомогенизации и пастеризации от 5 до 15% фосфолипидов оболочек шариков жира переходит в водную фазу. При сепарировании от 65 до 70% фосфолипидов молока переходит в сливки, при сбивании от 55 до 70% фосфолипидов сливок остается в пахте, остальные переходят в масло [6]. В таблице 1 указано содержание фосфолипидов в молоке, сливках и пахте [7].

Таблица 1 – содержание липидов и фосфолипидов в различных видах молочного сырья

Состав	Цельное молоко	Сливки	Пахта
Липиды, %	4,0	40,0	0,6
Фосфолипиды, масс.%	0,035	0,21	0,13
Соотношение фосфолипиды:липиды	0,0088	0,0052	0,5

Источник данных: [7]

Молочные фосфолипиды вызывают особый интерес и с точки зрения их состава. Основными фосфолипидами молока являются фосфатидилхолин (также известный как лецитин), фосфатидилэтаноламин (кефалин), сфингомиелин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозит. Фосфолипидный состав молока зависит от сезона, корма и других факторов. Сравнительный состав фосфолипидов сои, яичного желтка и молока приведен в таблице 2 [7].

Таблица 2 – Состав фосфолипидов сои, яичного желтка и молока

% от общего количества фосфолипидов	Соя	Яичный желток	Молоко
Фосфатидилхолин	34	75	27
Фосфатидилэтаноламин	21	15	25
Фосфатидилинозит	18	0,4	8
Сфингомиелин	0	1,5	24
Фосфатидилсерин	0,5	0	12
Фосфатидная кислота	9	0	0
Другие	17,5	8,1	4

Источник данных: [7]

В отличие от сои и яичного желтка, особая ценность фосфолипидов молока связана с высоким содержанием фосфатидилсерина и сфингомиелина. Эти липиды содержатся в мозге человека и почти не поступают в организм человека с другими пищевыми продуктами [2]. Считается, что снижение когнитивных способностей и развитие нейродегенеративных заболеваний сопровождается снижением количества этих фосфолипидов в мозге человека. Множество исследований демонстрируют важность фосфатидилсерина и сфингомиелина для роста и развития мозга у детей [5]. Альтернативным источником фосфатидилсерина и сфингомиелина является мозг крупного рогатого скота, однако потенциальный риск заболевания животных губчатой энцефалопатии и сложность переработки сырья не делают его привлекательным источником фосфатидилсерина и сфингомиелина [8]. Таким образом, молоко, по сути, является единственным доступным диетическим источником этих фосфолипидов. В целом, фосфолипиды имеют много других полезных свойств для здоровья человека. Они помогают организму против сердечно-сосудистых заболеваний, а также некоторых воспалительных и онкологических процессов [9, 10].

Современный рынок пищевой промышленности предъявляет ряд требований для ингредиентов, в том числе для эмульгаторов. Например, с учетом того, что около 95% мирового производства сои ГМО происхождения, есть потребность в альтернативном источнике натуральных эмульгаторов. Такую альтернативу может предложить использование фосфолипидов молока.

В последнее время продемонстрировано, что фосфолипиды молока не просто могут использоваться в качестве альтернативы соевому лецитину, но и могут формировать превосходящие по стабильности эмульсии. Считают, что это связано с отличием в составе фосфолипидов (более высокое содержание сфингомиелина и фосфатидилсерина в смеси), а также благодаря наличию комплексов с молочными белками. Таким образом, ценным сырьем, по сути, являются остатки МЖГМ, а именно липопротеидные комплексы молока [11, 12].

МЖГМ могут быть выделены как из цельного молока, так и из побочных продуктов переработки, например из молочной пахты. Соответственно, выделение липопротеидного комплекса из побочных продуктов переработки молока может увеличить ценность переработки сырья. Есть данные о том, что тип исходного сырья и способ его переработки влияют на эмульсионные свойства липопротеидного комплекса из МЖГМ, однако эти данные пока очень ограничены. В частности, продемонстрировано, что сепарация фосфолипидов молока от белков ухудшает эмульгирующие свойства. Также продемонстрировано, что эмульсии с МЖГМ стабильны при температурах до 65 градусов [4].

По аналогии с жировыми шариками фосфолипиды могут образовывать и другие аналогичные структуры, которые называют липосомами. По сути, липосомы являются наноконтейнерами, внутрь которых могут включаться другие химические молекулы. Это свойство ранее использовалось для направленной доставки активных компонентов онкологических препаратов. Фосфолипиды используют для улучшения биодоступности, повышения растворимости и защиты активных компонентов и в других фармацевтических и пищевых продуктах. Фосфолипиды молока также могут формировать липосомы. Более того, как показали последние исследования, такие липосомы обладают рядом достоинств. Благодаря составу фосфолипидов проницаемость их мембраны ниже, а устойчивость к изменениям температуры и pH выше по сравнению с липосомами из соевых фосфолипидов. Несколько групп исследователей также показали успешные примеры инкапсулирования внутрь липосом куркумина и полифенолов зеленого чая. Также липосомальные продукты находят все большее применение на рынке БАД, например, мелатонин или витамины в липосомальной форме [4].

В лабораторной и технологической практике для получения и очистки фосфолипидов чаще всего используют методы экстракции растворителями. В зависимости от назначения целевого сырья могут быть использованы хлороформ, метанол, этанол, ацетон и другие растворители. Наиболее эффективно осуществлять экстракцию методом Фолча с использованием смеси хлороформ-метанол (2:1) и соотношением количества растворителя к сырью около 20 [2]. В некоторых случаях могут возникать затруднения при разделении фаз смесью растворителей, особенно при наличии в смеси поверхностно активных веществ или остатков белков. По собственному опыту, в этом случае целесообразно проводить экстракцию с добавлением насыщенного солевого раствора, используя соотношение растворителей по методу Блая-Дайера хлороформ-метанол-водная фаза 1:2:0,8, а для разделения фаз использовать центрифугирование. Для удаления остатков триглицеридов смесь дополнительно обрабатывают ацетоном [2].

И хотя такие методы широко используются в лабораторной и исследовательской практике, есть целый ряд затруднений для их использования в производственной технологии. Во-первых, использование токсических

растворителей часто невозможно или недопустимо для получения продукта пищевого или фармацевтического назначения в связи с трудностями удаления остаточных растворителей. В качестве альтернативы хлороформу и метанолу для получения яичного лецитина используют, например, этиловый спирт. Тем не менее, в этом случае приходится жертвовать выходом и использовать значительные количества растворителя. В последнее время все большее применение находят методы суперкритической CO_2 экстракции, которые являются безопасными с точки зрения используемого растворителя (сжиженный CO_2) и дают возможность его рекуперации [13]. Однако пока нет данных о широком применении этого метода для получения фосфолипидов из-за значительной стоимости оборудования и ограниченной производительности.

Мембранные методы являются недорогой альтернативой методам экстракции из молочного сырья. По имеющимся в литературе данным, а также своему опыту ультрафильтрация и микрофильтрация позволяют успешно отделять фракции фосфолипидов из пахты [14]. Несмотря на доступность таких методов, в Беларуси отсутствуют технологии выделения фосфолипидов либо липопротеидного комплекса из молока. Соответственно, потенциал молочных фосфолипидов остается неиспользованным.

Существует целый ряд аналитических методик для качественного и количественного обнаружения фосфолипидов. Наиболее удобным и доступным методом для обнаружения является метод тонкослойной хроматографии, однако в первую очередь это метод качественного, а не количественного анализа. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для фосфолипидов требуют особых хроматографических колонок с дефекацией по светорассеянию [5]. По имеющимся данным, в Беларуси никто таких тестов сейчас не делает. Еще одной проблемой при использовании ВЭЖХ для обнаружения фосфолипидов является то, что это каждый из фосфолипидов, например, фосфатидилхолин, представляет собой не одно химическое вещество, а смесь соединений, имеющих различные остатки жирных кислот в своем составе. По опыту прошлых исследований, еще одним эффективным методом анализа является использование метода ядерного магнитного резонанса на ядрах фосфора ^{31}P . Метод позволяет достаточно точно определять классы фосфолипидов в смеси, но требует тщательной пробоподготовки и дорогостоящего оборудования [15]. Таким образом, перед исследователями могут стоять определенные затруднения при определении точного состава фосфолипидов в смесях из биологических источников. Наиболее доступным, но трудоемким для исследователей является метод определения фосфолипидов через определение органического фосфора. Однако, в случае определения фосфолипидов молока этот метод требует особенно тщательной очистки фракции фосфолипидов, чтобы избежать наличие других фосфорсодержащих веществ в исследуемой смеси [5].

Закключение. Фосфолипиды молока объединяют в себе ценные для пищевой промышленности биологические и технологические свойства. Их существование в виде липопротеидного комплекса обеспечивает им эмульгирующие свойства, превосходящие по своим характеристикам свойства соевого лецитина. Также они могут использоваться для улучшения характеристик БАД, например, повышения биодоступности или растворения активных веществ. Терапевтический потенциал обеспечивается наличием фосфатидилсерина и сфингомиелина, что дает возможность использовать изоляты молочных фосфолипидов в качестве компонентов функционального питания для пожилых людей, либо включать в рацион детского питания.

Разработка методов выделения фосфолипидов молока в чистом виде либо в виде липопротеидного комплекса позволит молокоперерабатывающим предприятиям получать новый ценный продукт, богатый фосфатидилсерином и сфингомиелином.

Для его получения целесообразно использовать мембранные методы (микрофильтрацию и ультрафильтрацию). Итоговый продукт — это эффективный эмульгатор для продуктов питания, обладающий дополнительной биологической активностью, являясь дополнительным источником фосфатидилсерина и сфингомиелина.

Список использованных источников

1. Шейфель, О. А. Биохимия молока и молочных продуктов. Конспект лекций. Кемерово: КемТИПП. – 2010. – 126 с.
1. Shejfel', O. A. Biohimija moloka i molochnyh produktov. Konspekt lekcij [Biochemistry of milk and dairy products]. Kemerovo: KemTIPP. – 2010. – 126 s.
2. Natural phospholipids: Occurrence, biosynthesis, separation, identification, and beneficial health aspects / Ali AH [et al.] // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2019. – Vol. 59(2) – P. 253–275.
3. Milk phospholipids: a new ingredient for formulation of functional foods with bioactivity / H. Burling [et al.] // *Inform (Champaign).* – 2009. – Vol. 20. – P. 494–496.
4. Milk fat globule membrane and buttermilks: From composition to valorization / Vanderghem (et al.) // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2010. – Vol. 14. – P. 485–500.
5. Contarini, G. Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies / G. Contarini, M. Povolo // *Int J Mol Sci.* – 2013. – Vol. 14, iss 2. – P.2808–2831.
6. Богатова, О.В. Химия и физика молока: учебное пособие / О.В. Богатова, Н.Г. Догарева. – Оренбург: ГОУ ОГУ. – 2004. – 137 с.
6. Bogatova, O.V. Himija i fizika moloka: uchebnoe posobie [Milk chemistry and physics] / O.V. Bogatova, N.G. Dogareva. – Orenburg: GOU OGU. – 2004. – 137 s.
7. MacGibbon, A.K.H. Composition and Structure of Bovine Milk Lipids / P.F. Fox, P.L.H. McSweeney // *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids.* – Boston : Springer, 2006. – Ch. 1. – P. 1–42.
8. Isolation and Analysis of Phospholipids in Dairy Foods / Pimentel L. [et al.] // *J Anal Methods Chem.* – 2016. Vol.2016:9827369 – P. 1–12.
9. Conway, V. Buttermilk: Much more than a source of milk phospholipids / V. Conway, S.F. Gauthier, Y. Pouliot // *Animal Frontiers.* – 2014. – Vol.4, iss.2. – P. 44–51.
10. Rodríguez-Alcalá, L. M., Castro-Gómez, M. P., Pimentel, L. L., & Fontecha, J. (2017). Milk fat components with potential anticancer activity-a review / L. Rodríguez-Alcalá [et al.] // *Bioscience reports* – Vol. 37, iss.6 – P. 1–18.
11. Comparison of emulsifying properties of milk fat globule membrane materials isolated from different dairy by-products / T.T.Q. Phan [et al.] // *J Dairy Sci.* – 2014. – Vol. 97, iss. 8. – P. 4799–4810.
12. Properties of emulsions from milk fat globule membrane and its components / H. Shenghua [et al.] // *Int J Food Prop* – 2017. – Vol. 20 – P. 1342–1353.

13. Boselli, E. Supercritical carbon dioxide extraction of phospholipids from dried egg yolk without organic modifier / E. Boselli, MF Caboni // *J Supercrit Fluid* – 2000. – Vol. 19, iss. 1 – P. 45–50.

14. Use of ultrafiltration and supercritical fluid extraction to obtain a whey buttermilk powder enriched in milk fat globule membrane phospholipids / M. R. Costa [et al.] // *Int Dairy J.* – 2010. – V. 20, iss. 9. – P. 598–602.

15. ³¹P-ЯМР-спектроскопический контроль получения фосфолипидов с помощью фосфолипазы D / А.И. Василькевич [и др.] // *Известия НАН Беларуси.* – 2015. – №2 – С. 68–71.

15. ³¹P-ЯМР-спектроскопический контроль получения фосфолипидов с помощью фосфолипазы D [31P NMR analysis of phospholipids synthesized with help of phospholipase D] / A.I. Vasil'kevich [i dr.] // *Izvestija NAN Belarusi.* – 2015. – №2 – С. 68–71.