

УДК 663.25

UDC 663.25

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
И РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНСЕРВАНТОВ
МИКРОБИАЛЬНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ
В ВИНОДЕЛЬЧЕСКОЙ
ПРОДУКЦИИ**

**THE THEORETICAL BASIS
AND DEVELOPMENT
OF THE METHOD
OF DETERMINATION
OF MICROBIAL
PRESERVATIVES
IN WINE PRODUCTION**

Антоненко Михаил Викторович
канд. техн. наук
научный сотрудник

Antonenko Mihail
Cand. Tech. Sci.
Research Associate

Гугучкина Татьяна Ивановна
д-р с.-х. наук, профессор
заведующая НЦ «Виноделие»,
e-mail: guguchkina@mail.ru

Guguchkina Tatyana
Dr. Sci. Agr., Professor
Head of SC «Wine-making»,
e-mail: guguchkina@mail.ru

Гапоненко Юрий Васильевич
канд. техн. наук
научный сотрудник

Gaponenko Yuriy
Cand. Tech. Sci.
Research Associate

Абакумова Алла Андреевна
младший научный сотрудник

Abakumova Alla
Junior Research Associate

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт садоводства
и виноградарства», Краснодар, Россия*

*Federal State Budget Scientific
Organization “North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture”,
Krasnodar, Russia*

В течение последних десятилетий резко возросло использование различных консервантов в пищевой промышленности, в том числе антибиотиков. Применение консервантов является необходимостью для продления сроков годности продукции путем защиты от микробной порчи, однако появляются реальные факты обнаружения антибиотиков в образцах винодельческой продукции. Целью исследований являлось теоретическое обоснование и разработка методики определения консервантов микробного происхождения в винах. Объектами исследований были пробы винодельческой продукции, а также пищевая добавка – натамакс. Указано, что заслуживают внимания консерванты микробного происхождения – натамицин и низин, так как существуют научные споры об их использовании

For the last decades the use of various means of preservation are sharply increased in the food industry, including antibiotics. Use of means of preservation is need for prolongation of expiration dates of production by way of protection against microbic damage, however there are real the facts of antibiotics detection in the samples of wine-making production. The purpose of research was the theoretical justification and development of a technique of definition of microbial origin preservatives in the wines. The samples of wine-making production, and also a food samplement – Natamaks were the objects of research. It is noted that preservatives of mikrobial origin – Natamitsin and Nizin merit the attention as there are the scientific disputes about their use in the industrial wine-

в промышленном виноделии.

Их применение связано с отсутствием влияния на органолептику продукта, подвергающегося обработке.

Показано, что еще не изучены последствия взаимодействия антибиотиков с компонентным составом винодельческой продукции, а также нормы их использования в различных условиях. Поэтому вопросы о возможности применения натамицина и низина в виноделии и разработка доступной методики обнаружения их остаточных количеств в готовой продукции актуальны. Мониторинг винодельческого рынка России по содержанию антибиотиков не проводился. В статье рассмотрены возможности и новые методические подходы для анализа консервантов микробного происхождения в винодельческой продукции с помощью капиллярного электрофореза. Предложены методические решения по определению антибиотика натамицина в винодельческой продукции. Указано, что использование высокоэффективного капиллярного электрофореза в качестве аналитического метода для определения консервантов микробного происхождения будет способствовать проведению мониторинга винодельческого рынка России на предмет содержания антибиотиков и обеспечению безопасности винодельческой продукции.

Ключевые слова: ВИНО, ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ, АНТИБИОТИКИ, МЕТОДЫ АНАЛИЗА, КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

making. Their application is connected with lack of influence on an organoleptic of the product which is exposed to processing. It is shown that consequences of interaction of antibiotics with component content of wine-making production, and also the norms of their use under the various conditions aren't studied yet. Therefore the questions of possibility of application of a Natamitsin and Nizin in the wine-making and development of an available technique of detection of their residual quantities in the finished production are actual. Monitoring of the wine-making market of Russia according to the maintenance of antibiotics wasn't carried out. In the article the opportunities and new methodical approaches for the analysis of preservatives of a mikrobian origin in the wine-making production by means of a capillary electrophoresis are considered. The methodical solutions on definition of Natamitsin antibiotic in the wine-making production are proposed. It is specified that the use of a highly effective capillary electrophoresis as an analytical method for definition of preservatives of a mikrobian origin will promote the carrying out of monitoring of the Russia wine-making market as regard the maintenance of antibiotics and safety of wine-making production.

Key words: WINE, CONSUMER SAFETY, ANTIBIOTICS, METHODS OF ANALYSIS, CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Введение. В течение последних десятилетий резко возросло использование различных консервантов в пищевой промышленности, в том числе антибиотиков. С одной стороны применение консервантов является необходимостью для продления (увеличения) сроков годности продукции путем защиты от микробной порчи и/или роста патогенных микроорганизмов, а с другой – появляются реальные факты обнаружения антибиотиков в образцах вино-

Плодоводство и виноградарство Юга России № 34(04), 2015 г.

дельческой продукции, в которых их использование в настоящее время ограничено или запрещено [1, 2]. В соответствии с Комплексной Программой развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г. (утв. Председ. Правит. РФ 24.04.2012 №1853-ПВ) важным направлением развития сектора пищевых биотехнологий России является обеспечение биобезопасности пищевых продуктов. Считаем, что разработка методов контроля качества пищевых продуктов, в том числе методов качественного и количественного определения антибиотиков, входящих в их состав, или продукции, полученной с применением таких антибиотиков, является актуальной и своевременной. В связи с этим целью исследований являлось теоретическое обоснование и разработка методики определения консервантов микробиального происхождения в винодельческой продукции.

Объекты и методы исследований. Работа выполнена в научном центре «Виноделие» Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства. Анализы по определению консервантов микробиального происхождения проводились с помощью метода капиллярного электрофореза, реализуемого на системе «Капель 105», и компьютерной программы «Мультихром». Объектами исследований были пробы винодельческой продукции, а также пищевая добавка E235 (НатамаксTM, производство Дания).

Обсуждение результатов. В настоящее время, согласно ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств», разрешенными к применению консервантами в винодельческой продукции являются пищевые добавки указанные в табл. 1. Наиболее важным аспектом применения любых консервантов являются их токсикологические характеристики. Очевидно, что любые пищевые добавки, разрешенные для использования в пищевой промышленности должны быть безопасными для потребления человеком. Безопасность

некоторых пищевых противомикробных препаратов была поставлена под сомнение, что привело к ограничениям на их использование [1-4].

Таблица 1 – Гигиенические нормативы применения консервантов

| Наименование пищевой добавки (индекс E) | Продукция | Максимальный уровень в продукции |
|--|---|---|
| Сульфиты в пересчете на диоксид серы (E220-E229) | Вина виноградные | 300 мг/кг |
| | Вина плодовые, в том числе шипучие, сидр; медовые вина | 200 мг/кг |
| | Вина безалкогольные | 200 мг/кг |
| Сорбиновая кислота (E200) и ее соли сорбаты | Напитки ароматизированные на винной основе | 200 мг/л |
| | Вина ординарные, плодовые, медовые, сидр, вина безалкогольные | 300 мг/кг |
| Диметилдикарбонат (E242) | Вина безалкогольные | 250 мг/л для обработки, остатки не допускаются |

В литературе встречаются сведения о возможности использования различных консервантов для предупреждения забраживания готовой винодельческой продукции. Во многих винодельческих странах проводились и в настоящее время проводятся исследования, имеющие целью найти заменители сернистой кислоты. Основным направлением в этих исследованиях были поиски антибиотиков, оказывающих антисептическое действие на микроорганизмы сула и вина. В результате исследований [5] в этом направлении французских, немецких и итальянских авторов выделен ряд антибиотиков, обладающих антисептическими свойствами. Однако они не допущены в пищевую промышленность органами санитарии вследствие их вредного действия на пищеварительную систему.

Некоторые авторы [5] описывают ряд антибиотиков, которые исследовались как заменители сернистого ангидрида при изготовлении виноградного сока и полусладких вин. Среди этих антибиотиков лучшие результаты были получены с актидионом, антимицином и микостатином; они обладают стабилизирующими свойствами, не придают вину и соку никакого привкуса и посто-

ронного запаха и вполне пригодны с органолептической точки зрения. Однако авторы не рисковали рекомендовать эти антибиотики для широкого использования. В настоящее время установлено, что употребление вышеуказанных антибиотиков с пищей вредно для здоровья человека и ведет к тому, что микробы, находящиеся в организме, в том числе и патогенные, приобретают иммунитет к антибиотикам и в дальнейшем введение в организм в случае заболевания даже таких сильнодействующих антибиотиков, как пенициллин и стрептомицин, не оказывает лечебного действия.

Та же судьба постигла предложенные различными авторами химические препараты: монобромуксусную кислоту, бензойнокислый натрий, пропионат натрия, а также витамин К₅ и другие. Все эти вещества, как вредные для организма человека, не допущены органами санитарии к применению в качестве антисептиков в пищевой промышленности [6].

Пристального внимания заслуживают консерванты микробиального происхождения – натамицин (Е 235) и низин (Е 234), так как существуют научные споры об их использовании в промышленном виноделии для остановки алкогольного брожения, стабилизации вин после розлива и т.п. [7]. Их применение связано с отсутствием влияния на органолептику продукта, подвергающегося обработке и ряда других причин.

Натамицин относится к группе макролидных антибиотиков. Противогрибковая деятельность основывается на способности взаимодействия со стеринами в клеточной мембране грибов, и является причиной их гибели (Juan F., 2009). Структурная формула натамицина изображена на рис. 1.

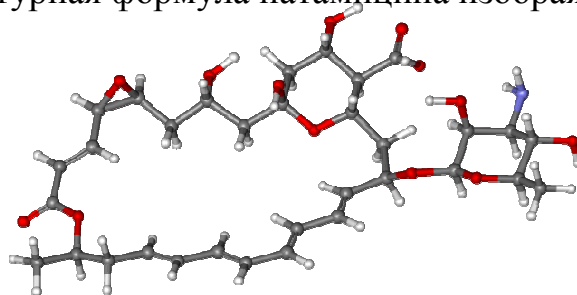


Рис. 1. Структурная формула натамицина

Низин по химической структуре принадлежит к белкам – полипептидам, который задерживает рост различных микроорганизмов. Низин как антибиотик способен снижать сопротивляемость спор термоустойчивых бактерий к нагреванию и не влияет на органолептику продукта, по отношению к которому он может быть применен (А.С. Булдаков, 1996 г.). Структурная формула низина изображена на рисунке 2.

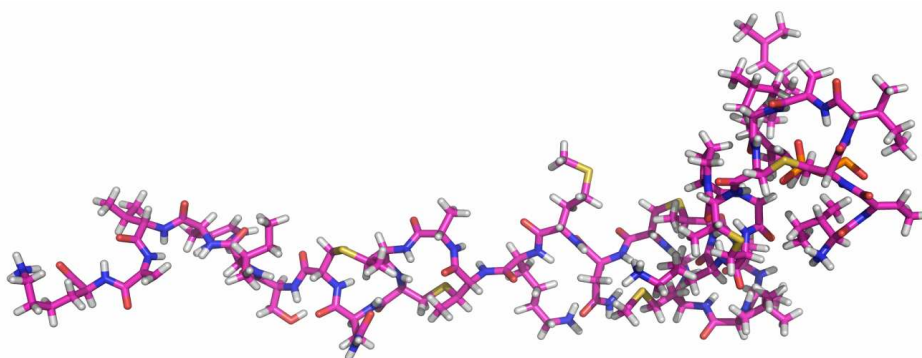


Рис. 2. Структурная формула низина

На сегодняшний день еще не изучены последствия взаимодействия антибиотиков с компонентным составом винодельческой продукции, а также нормы их использования в различных условиях, поэтому вопросы о возможности применения натамицина и низина в виноделии и разработке доступной методики обнаружения их остаточных количеств в готовой продукции актуальны. Разнообразие технических возможностей, которые реализуются в приборах системы капиллярного электрофореза, позволяет разрабатывать новые методики под конкретную задачу [8-11].

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) с успехом применяется для анализа разнообразных веществ и объектов: катионов металлов, неорганических и органических анионов, аминокислот, витаминов, наркотиков, пигментов и красителей, белков, пептидов, анализа фармпрепаратов и пищевых продуктов. А также для контроля качества вод и напитков, технологического контроля производства, входного контроля сырья, в криминалистике, меди-

цине, биохимии, в том числе, для целей расшифровки генетического кода живых организмов и т.д. Мониторинг винодельческого рынка России на предмет содержания антибиотиков не проводился. В связи с этим актуальным является разработка простой и доступной методики определения антибиотиков в вине методом КЭ.

Специалистами научного центра «Виноделие» разработана методика определения антибиотика натамицина запрещенного для винодельческой продукции, электрофореграммы стандартного раствора натамицина и образца винодельческой продукции приведены на рис. 3. Совокупность проработанных этапов для определения консервантов микробиального происхождения в винодельческой продукции приведена на рис. 4.

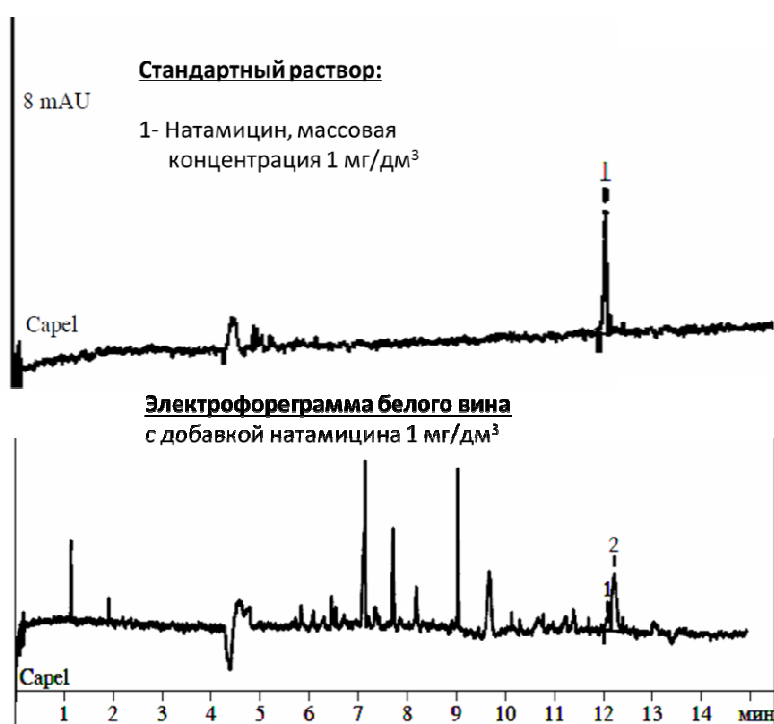


Рис. 3. Электрофореграммы стандартного раствора натамицина и образца винодельческой продукции (белого вина)

Метод измерений основан на разделении компонентов пробы и количественном определении антибиотика методом КЭ. Детектирование проводят

по прямому поглощению при длине волны 303 нм. Пробоподготовка заключается в фильтрации, разбавлении дистиллированной водой и центрифугировании пробы. Нижняя граница диапазона измерений массовой концентрации натамицина в винах составляет 0,2 мг/дм³. Для уменьшения предела количественного определения натамицина, возможно использовать дополнительную подготовку с приемами концентрирования.

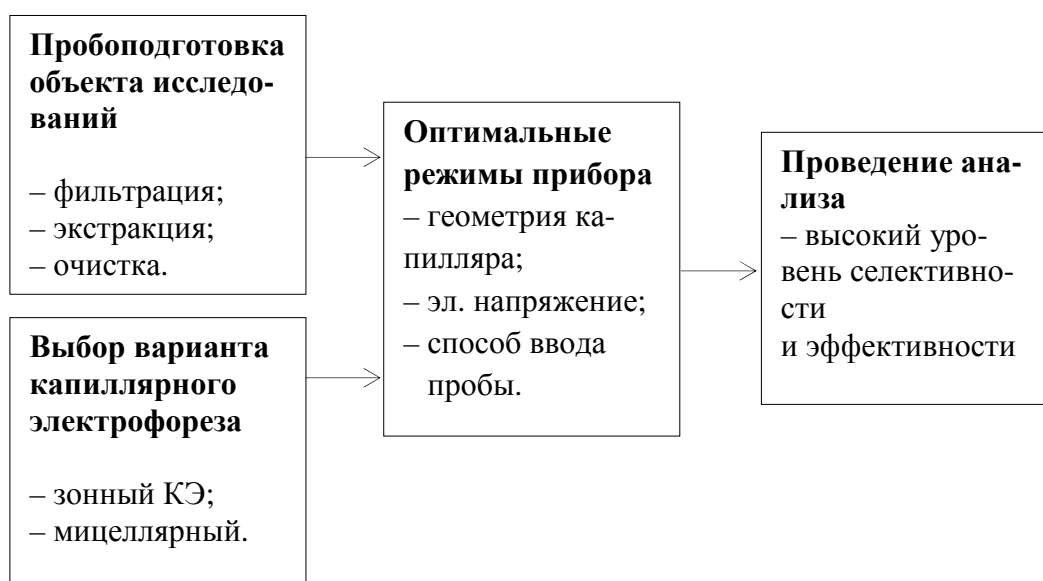


Рис. 4. Совокупность этапов для определения консервантов микробиального происхождения в винодельческой продукции

Для уменьшения предела количественного определения натамицина, а также для очистки анализируемых проб от нежелательных компонентов нами предлагается использовать дополнительную пробоподготовку с приемами концентрирования.

Разработана и утверждена методика для проведения лабораторных исследований безопасности винодельческой продукции научно-исследовательскими учреждениями, а также испытательными центрами и лабораториями, осуществляющими контроль качества продовольственного сырья, которая оформлена в виде СТО 00668034–052–2014 «Продукция винодельческая. Метод выделения консервантов микробиального происхожде-

ния». Данная методика устанавливает метод подготовки проб для выделения консерванта натамицина с целью его последующего анализа методом высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭ).

Выводы. Установлено, что в течение последних десятилетий резко возросло использование различных консервантов в пищевой промышленности, в том числе и в виноделии. Выявлены реальные факты обнаружения антибиотиков (консервантов микробиального происхождения) в винах, в которых их использование в настоящее время не разрешается. Использование высокоэффективного капиллярного электрофореза в качестве аналитического метода для количественного определения консервантов микробиального происхождения будет способствовать проведению мониторинга винодельческого рынка России на предмет содержания антибиотиков и обеспечению биобезопасности винодельческой продукции. Выдвинута гипотеза, что применение консервантов микробиального происхождения в технологии виноградных вин способно оказать существенное влияние на биохимические превращения в винодельческой продукции, а также снижать её потребительскую безопасность.

Литература

1. Paseiro-Cerrato, R. Rapid method to determine natamycin by HPLC-DAD in food samples for compliance with EU food legislation / R. Paseiro-Cerrato, P. Otero-Pazos, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, R. Sendón, I. Angulo, P. Paseiro-Losada // Food Control, Volume 33, Issue 1, September 2013, Pages 262-267.
2. Repizo, L. M. A novel and rapid method for determination of natamycin in wines based on ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: validation according to the 2002/657/EC European decision / Leonardo Mariño Repizo, Luis Dante Martinez, Roberto A. Olsina, Soledad Cerutti, Julio Raba // Anal Bioanal Chem. – 2012. – 402. P/ 965–973.
3. Antimicrobials in food / edited by P. Michael Davidson, John N. Sofos, A.L. Branen. - 3rd ed. – 721p.
4. Villiers, A. Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review / A. Villiers // Analytica Chimica Acta. – 730. – 2012. – p. 2– 23.
5. Кишковский, З.Н. Химия вина / З.Н. Кишковский, И.М. Скурихин. – М.: Агропромиздат, 1988. – 254 с.
6. Родопуло, А.К. Основы биохимии виноделия/ А. К. Родопуло. – М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1983. – 240 с.

7. Rojo-Bezares, B. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria / B. Rojo-Bezares and el. // *International Journal of Food Microbiology* 116 (2007) 32–36.

8. Оселедцева, И.В. Методика определения ароматических альдегидов и кислот в коньячной продукции / И.В. Оселедцева, Т.И. Гугучкина, К.В. Резниченко, М.В. Антоненко // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология.* – 2013. – № 1 (331). – С. 96.

9. Антоненко, М.В. Технологические приемы производства столовых вин без остаточных количеств триазолов: монография. – Краснодар: ГНУ Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, 2012. – 112 с.

10. Гугучкина, Т.И. Актуальность разработки методики определения антибиотиков в вине методом капиллярного электрофореза / Т.И. Гугучкина, А.А. Абакумова, М.В. Антоненко, М.Г. Марковский // *Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ.* – 2013. – Т. 4. – С. 217-218.

References

1. Paseiro-Cerrato, R. Rapid method to determine natamycin by HPLC-DAD in food samples for compliance with EU food legislation / R. Paseiro-Cerrato, P. Otero-Pazos, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, R. Sendón, I. Angulo, P. Paseiro-Losada // *Food Control*, Volume 33, Issue 1, September 2013, Pages 262-267.

2. Repizo, L. M. A novel and rapid method for determination of natamycin in wines based on ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: validation according to the 2002/657/EC European decision / Leonardo Mariño Repizo, Luis Dante Martinez, Roberto A. Olsina, Soledad Cerutti, Julio Raba // *Anal Bioanal Chem.* – 2012. – 402. P/ 965–973.

3. *Antimicrobials in food* / edited by P. Michael Davidson, John N. Sofos, A.L. Branen. - 3rd ed. – 721p.

4. Villiers, A. Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review / A. Villiers // *Analytica Chimica Acta.* – 730. – 2012. – r. 2– 23.

5. Kishkovskij, Z.N. *Himija vina* / Z.N. Kishkovskij, I.M. Skurihin. – М.: Agropromizdat, 1988. – 254 s.

6. Rodopulo, A.K. *Osnovy biohimii vinodelija*/ A. K. Rodopulo.– М.: Legk. i pishh. prom-st', 1983. – 240 s.

7. Rojo-Bezares, B. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria / B. Rojo-Bezares and el. // *International Journal of Food Microbiology* 116 (2007) 32–36.

8. Oseledceva, I.V. Metodika opredelenija aromaticeskikh al'degidov i kislot v kon'jachnoj produkcii / I.V. Oseledceva, T.I. Guguchkina, K.V. Reznichenko, M.V. Antonenko // *Izvestija vysshih uchebnyh zavedenij. Pishhevaja tehnologija.* – 2013. – № 1 (331). – S. 96.

9. Антоненко, М.В. Технологические приемы производства столовых вин без остаточных количеств триазолов: Монография. – Краснодар: ГНУ Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства Россельхозакадемии. – 2012. – 112 с.

10. Гугучкина, Т.И. Актуальность разработки методики определения антибиотиков в вине методом капиллярного электрофореза / Т.И. Гугучкина, А.А. Абакумова, М.В. Антоненко, М.Г. Марковский // *Науч. тр. ГНУ Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства Россельхозакадемии.* – 2013. – Т. 4. – С. 217-218.