

*Eliza Gruczyńska, Dorota Kowalska, Katarzyna Tarnowska,
Mariola Kozłowska, Bolesław Kowalski*

OTRZYMYWANIE SUBSTYTUTÓW TŁUSZCZU MLEKA LUDZKIEGO W JEDNOETAPOWEJ ENZYMATYCZNEJ ACYDOLIZIE SMALCU

Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności
SGGW w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *E. Bialecka-Florjańczyk*

Substytuty mleka ludzkiego (HMFS) zawierają strukturyzowane lipidy, które odzwierciedlają skład oraz molekularną strukturę triacylogliceroli obecnych w tłuszczu mleka ludzkiego. Obecnie HMFS są produkowane głównie z oleju palmowego i jego frakcji oraz tłuszczu mlekowego. Od niedawna prowadzone są badania dotyczące enzymatycznych technologii otrzymywania HMFS z tłuszczów zwierzęcych (smalec, olej z tuńczyka) i roślinnych. W pracy opisano otrzymywanie HMFS przez enzymatyczną acydolizę smalcu kwasami tłuszczowymi, oczyszczenie otrzymanego produktu i uzupełniające mieszanie. Zbadano właściwości i dokonano punktowych ocen otrzymywanych HMFS.

Hasła kluczowe: Substytuty tłuszczu mleka ludzkiego, kwas palmitynowy, PUFA, smalec, oleje z ryb.

Key words: Human milk fat substitutes, palmitic acid, PUFA, lard, fish oils.

Powszechnie przyjęta jest opinia, że mleko matki (HM) jest najlepszym pokarmem bezpośrednio po urodzeniu i w pierwszych 6-ciu miesiącach życia dziecka, aczkolwiek zalecane jest przedłużanie takiego karmienia do 12 miesiąca i dłużej (1). W przypadkach, gdy karmienie piersią z różnych względów staje się niemożliwe lub niepożądane, stosowane są inne rozwiązania. *Stevens* i wsp. (2) podają, powołując się na starożytny zapis (egipski papirus Ebersa), że już w 1550 p.n.e. stosowano alternatywne żywienie niemowląt. Wcześniej, bo już od 2000 p.n.e., stosowano karmienie niemowląt mlekiem innej niż matka kobiety. Ostatnie 25–30 lat to rozwój badań naukowych i komercjalizacja opracowywanych rozwiązań w alternatywnym karmieniu noworodków, niemowląt i małych dzieci. Współczesne trendy badawcze i osiągnięcia są szeroko relacjonowane w literaturze (3–5). Podstawowym wskaźnikiem strategicznym w badaniach jest skład HM, a celem opracowanie takiej mieszanki (substytutu – HMS), aby jak najmniej różniła się od HM, a zawarty w niej tłuszcz jak najmniej różnił się od tłuszczu z HM w zakresie składu i właściwości.

Analiza tłuszczu mleka matki (HMF) wskazuje na problemy dotyczące składu i struktury obecnych triacylogliceroli (TAG). Należy tu wymienić główne kwasy tłuszczowe: palmitynowy (P, 16:0) i stearynowy (S, 18:0), kwas oleinowy (O, 18:1), kwasy linolowy (L, 18:2) i linolenowy (Ln, 18:3) oraz kwasy arachidonowy (ARA,

20:4 n-6) i dokozaheksaenowy (DHA, 22:6 n-3). Kwasy ARA i DHA biorą udział w procesach fizjologicznych w organizmie dziecka, w szczególności w kształtowaniu budowy i rozwoju mózgu oraz systemu wzrokowego (siatkówki oka). ARA i DHA są syntetyzowane przez organizm dziecka (z kwasów L i Ln) jednakże wydolność w tym zakresie może być w początkowej fazie życia niemowlęcia niewystarczająca, co wymaga uzupełniania w diecie (3, 6, 7). Szczególnie ważną rolę w HMF odgrywa kwas palmitynowy. Występuje on w dominującej ilości w pozycji sn-2 TAG, co umożliwia jego łatwe przyswajanie w postaci sn-2 palmitynianu glicerolu, zapobiega niekorzystnemu powstawaniu i dalszemu wydalaniu palmitynianów wapnia i magnezu (8, 9) mogących prowadzić do odmineralizowania organizmu dziecka.

Celem przedstawionej pracy była ocena właściwości otrzymanego w jednoetapowej syntezie tłuszczu typu HMFS na drodze acydolizy smalcu mieszaniną kwasów tłuszczowych w obecności preparatu enzymatycznego Lipozyme RM IM, oczyszczenie produktu i uzupełniające mieszanie z olejem bogatym w PUFA.

MATERIAŁY I METODY

Materiały

Smalec (LRD) i oleje: rzepakowy (RSO), sojowy (SBO), słonecznikowy (SFO) kupowano w lokalnych sklepach sieci detalicznej. Olej z tuńczyka (TO – prod. Hiszpania) otrzymano ze źródeł prywatnych. Oleje były świeże z początku okresów przydatności do spożycia i wykazywały wartości liczb kwasowych AV < 0,3 mg KOH/g (oleje RSO, SBO, SFO) i AV < 0,9 mg KOH/g (LRD, TO) oraz liczb nadtlenkowych PV < 0,4 meq O₂/kg tłuszczu dla RSO, SBO, SFO i PV < 2,0 meq O₂/kg tłuszczu dla LRD i TO. Skład i rozkład kwasów tłuszczowych oznaczano metodą chromatografii gazowej. Jako katalizator przeestryfikowania (acydolizy) stosowano preparat enzymatyczny Lipozyme RM TM (sn-1,3 specyficzna immobilizowana lipaza z *Rhizomucor miehei*). Aktywność preparatu Lipozyme RM IM wynosi 5–6 BAUN/g, a fabryczna zawartość wody w preparacie – 4%. Kwas dekanowy C10:0, lipaza trzustkowa sole żółciowe pochodziły z firm Merck i Sigma-Aldrich. Stosowane KOH, HCl, rozpuszczalniki i gazy techniczne były klasy cz.d.a. lub cz. do chromatografii.

Metody analityczne

Oznaczenia liczb charakteryzujących tłuszcze wykonywano zgodnie z PN-EN ISO 660:2010 (AV) i PN-EN ISO 3960:2012 (PV). Skład kwasów tłuszczowych oznaczano metodą chromatografii gazowej po przekształceniu kwasów w ich estry metylowe. Rozkład (dystrybucję pomiędzy pozycje sn-1,3 i sn-2) kwasów tłuszczowych w TAG oznaczano metodą *Brockerhoffa* (10) zgodnie z postępowaniem opisanym w innej pracy z naszego laboratorium (11). Podano tam również dane dotyczące smalcu i oleju rzepakowego.

Kwasy tłuszczowe do acydolizy smalcu

Oleje RSO, SBO, SFO mieszano w stosunku 1:1:1 i następnie poddawano wyczerpującemu zmydlaniu etanolowo-wodnym roztworem NaOH. Powstałe mydła

oddzielano, przemywano i zadawano roztworem HCl. Powstałe kwasy tłuszczowe pochodzące ze zmydlanych olejów ekstrahowano mieszaniną (1:1, v/v) eteru dietylowego i octanu etylu. Rozpuszczalnik oddestylowano, a otrzymaną mieszaninę osuszonych wolnych kwasów tłuszczowych, wzbogaconą o dodatek kwasu C10:0, stosowano do acydolizy smalcu.

Acydoliza smalcu

50 g stopionej mieszaniny smalcu i kwasów tłuszczowych (1:2,5, mol/mol) umieszczano w kolbie i wstawiano do termostatu (61 ± 1°C) wytrząsarki wypełnionej syntetycznym olejem PAO-4. Po osiągnięciu zadanej temperatury do masy w kolbie dodawano 9% preparatu Lipozyme RM IM, kolbę przedmuchiwno azotem, szczelnie zamykano i wytrząsano przez 120 min po czym odsączało Lipozyme RM IM. Nieprzereagowane kwasy zobojętniano 0,05 M etanolem roztworem KOH. Po oddzieleniu roztworu soli potasowych produkt reakcji oczyszczano przez krystalizację.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wydajności syntez HMFS wahały się w granicach 38–48% i były zależne głównie od etapu oczyszczania surowej masy poreakcyjnej. Uzyskiwane partie HMFS po procesach zobojętniania i krystalizacji wykazywały wartości AV i PV odpowiednio w granicach 2,0–4,6 mg KOH/g i 3,6–5,0 meq O₂/kg. Te dane i słaba odporność na utlenianie wskazują na konieczność opracowania dokładniejszych metod rafinacji i stabilizacji antyoksydacyjnej surowych HMFS. Skład i rozkład kwasów tłuszczowych w otrzymanych produktach przed i po dodaniu (2–4%) oleju z tuńczyka wskazują na obecność do 1% PUFA i podwyższenie o 0,2–0,5% zawartości kwasu palmitynowego w sn-2. Produkty bezpośredniego przeestryfikowania mieszanin LRD+RSO+SFO+SBO+TO wykazywały gorsze parametry AV i PV. Wymagany byłby także nowy olej, np. z ziaren palmy będący nośnikiem kwasu C10:0. Obliczona w oparciu o pracę *Wanga* i wsp. (12) punktowa ocena zgodności z realnymi wzorcami HMF dała dobre wyniki. W uproszczonej procedurze obliczeń uwzględniano tylko 8 kwasów w sektorze I (nasycone o parzystej liczbie atomów węgla od C10:0 do C18:0 i nienasycone C16:1, C18:1, C18:2) oraz sześć z nich (bez C10:0 i C16:1) w sektorze II.

W obliczanym punktowym stopniu podobieństwa do wzorcowych HMF w równaniu $G = G1 + G2$ przyjęto zakresy dla G od 0 do 100, a dla G1 i G2 od 0 do 50. Parametry G1 i G2 opisują podobieństwo odpowiednio pod względem składu kwasów tłuszczowych w TAG i ich rozkładu w pozycjach sn-2. Wartości parametru G obliczone dla produktów acydolizy wynosiły 80–85 pkt. Dla RSO, SFO i smalcu wartość G wynosiła odpowiednio 25, 18 i 73 pkt. Czynnikiem zaniżającymi dla olejów były wartości parametru G2 wyliczane z danych dla sektora II – kwasy z pozycji sn-2. Uzyskana dla smalcu wysoka wartość $G = 73$ pkt wynikała z praktycznie równych ocen dla G1 i G2 (35–38 pkt każda) co oznacza, że smalec jest wyjątkowo dobrym, łatwo dostępnym i tanim substratem do produkcji HMFS. Ograniczeniem stosowania mogą być reguły religijne i zwyczaje żywieniowe (wegetarianizm, weganizm).

Tab e l a I. Skład % (Σ w TAG) i rozkład sn-2* głównych kwasów tłuszczowych oraz% udział danego kwasu w pozycji sn-2** dla olejów: słonecznikowego, sojowego, z tuńczyka oraz produktu acydolizy smalcu. Dane dla smalcu i RSO podano w (11).

Tab l e I. Overall and sn-2 positional fatty acid compositions of sunflower, soybean and tuna oils as well as lard acidolysis product. Experimental data for lard and RSO is given in (11).

Kwas tłuszczowy	Olej słonecznikowy			Olej sojowy			Olej z tuńczyka			Produkt acydolizy		
	Σ w TAG	sn-2*	sn-2**	Σ w TAG	sn-2*	sn-2**	Σ w TAG	sn-2*	sn-2**	Σ w TAG	sn-2*	sn-2**
10:0										4,3	0,2	1,5
16:0	6,0	0,2	1,0	11,0	1,9	5,8	22,7	21,6	31,7	17,3	36,6	69,4
16:1	0,2	tr	–	0,2	0,1	17,0	7,1	7,0	32,9	2,9	4,2	48,6
18:0	3,3	0,1	1,0	4,0	0,9	7,5	5,1	1,7	11,1	7,3	2,7	12,3
18:1 <i>cis</i>	27,8	28,4	34,1	22,7	24,3	35,7	19,1	11,5	20,1	30,2	22,5	24,8
18:2 all <i>cis</i>	60,1	71,8	39,8	51,9	66,7	42,8	2,7	2,9	35,8	33,0	25,4	25,7
18:3 all <i>cis</i>				8,4	7,7	30,6	0,4	0,5	41,7	5,2	7,5	47,9
20:1 9- <i>cis</i>							2,2	1,4	21,0	0,1#	tr	–
20:4 (ARA)							2,1	2,3	36,5	0,1#	tr	–
20:5 (EPA)							7,6	6,9	30,3	0,4#	0,4	33,4
20:6 (DHA)							19,8	35,7	60,1	1,0#	1,8	60,0

ARA = kwas arachidonowy, EPA = kwas eikozapentaenowy, DHA = kwas dokozaheksaenowy, # po dodaniu 5% TO do produktu acydolizy, tr = ślad. Rozkład kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-1,3 = $(3 \times \Sigma \text{ w TAG} - \text{sn-2}^*) : 2$.

WNIOSKI

1. Punktowa ocena zgodności produktów acydolizy z realnymi wzorcami HMF dała dobre wyniki, co wskazuje na przydatność smalcu w procesach otrzymywania HMFS.

2. Wyniki analiz AV i PV oraz słaba odporność na utlenianie wskazują na konieczność opracowania lepszych metod rafinacji i stabilizacji antyoksydacyjnej surowych HMFS.

E. Gruczyńska, D. Kowalska, K. Tarnowska, M. Kozłowska, B. Kowalski

HUMAN MILK FAT SUBSTITUTES PRODUCED BY ONE STEP ENZYMATIC ACIDOLYSIS OF LARD

Summary

Human milk (HM) is the best food for neonates and infants but when breast-feeding is impossible or undesirable the human milk substitutes (HMS) have to be used. They contain structured lipids (HMFS) that mimic the composition and molecular structure of TAG present in human milk fat (HMF). Currently HMFS are produced mainly from palm oil and its fractions and milk fat. Since recently the production of HMFS from animal fats (lard, tuna oil) and vegetable oils by enzymatic technologies have been studied.

In this paper the production of HMFS by enzymatic acidolysis of lard with fatty acids, purification of crude reaction product and its blending with tuna oil are reported. The properties of produced HMFS have been analysed and their scores evaluation has been performed.

PIŚMIENNICTWO

1. *Guo M.*: Introduction: trends and issues in breastfeeding and the use of infant formula. In: Human milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology, Ed. Guo M., Elsevier, 2014; 1-16.
- 2. *Stevens E.E., Patrick T.E., Pickler R.*: A history of infant feeding. *J. Perinat. Educ.*, 2009; 18 (2): 32-39.
- 3. *Koletzko B., Baker S., Cleghorn G., Neto U.F., Gopalan S., Hernell O., Hock Q.S., Jirapinyo P., Lonnerdal B., Pencharz P., Pzyrembel H., Ramirez-Mayans J., Shamir R., Turck D., Yamashiro Y., Zong-Yi D.*: Global standard for the composition of infant formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, 2005; 41: 584-599.
- 4. *Dobrzańska A., Charzewska J., Weker H., Socha P., Mojska H., Książyk J., Gajewska D., Szajewska H., Stolarczyk A., Marć M., Czerwionka-Szaflarska M., Ryżko J., Wąsowska-Królikowska K., Chojnowska Z., Chybicka A., Horvath A., Socha J.*: Normy żywienia zdrowych dzieci w 1-3 roku życia. Stanowisko Polskiej Grupy Ekspertów. Część I. Zapotrzebowanie na energię i składniki odżywcze. *Standardy Medyczne Pediatria*, 2012; 3: 313-316.
- 5. *Kowalska D., Gruczyńska E., Bryś J.*: Mleko matki – pierwsza żywność w życiu człowieka. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 2015; 96(2): 387-398.
- 6. *Koletzko B., Lien E., Agostini C.*, et al.: The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J. Perinat. Med.*, 2008; 36(1): 5-14.
- 7. *Lauritzen L., Hansen H.S., Jorgensen M.H., Michaelsen K.F.*: The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.*, 2001; 40: 1-94.
- 8. *Innis S.M., Dyer R., Nelson C.M.*: Evidence that palmitic acid is absorbed as sn-2 monoacylglycerol from human milk by breast-fed infants. *Lipids*, 2004; 29: 541-545.
- 9. *Bar-Yoseph F., Lifshitz Y., Cohen T.*: Review of sn-2 palmitate oil implications for infant health. *Prostag. Leukotr. Ess. (PLEFA)*, 2013; 89(4): 139-143.
- 10. *Brockerhoff H.*: A stereospecific analysis of triglycerides. *J. Lipid Res.*, 1965; 6: 10-15.
11. *Gruczyńska E., Kowalska D., Kozłowska M., Kowalska M., Kowalski B.*: Enzymatic interesterification of a lard and rapeseed oil equal-weight blend. *J. Oleo Sci.*, 2013; 62 (4): 187-193.
- 12. *Wang Y-H., Mai Q-Y., Quin X-L., Yang B., Wang Z-L., Chen F-T.*: Establishment of an evaluation model for human milk fat substitutes. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58: 642-649.

Adres: 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159 C