Charakterystyka sacharydów mleka oraz możliwości ich enzymatycznej modyfikacji -aspekty technologiczne i żywieniowe

Characteristics and enzymatic modification of milk saccharides - technological and nutritional aspects

Włodzimierz Bednarski

Natalia Kordala

Katedra Biotechnologii Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie

Na podstawie informacji z dostępnej literatury oraz wyników badań własnych przedstawiono aktualną wiedzę o sacharydach mleka ze szczególnym uwzględnieniem ich znaczenia w żywieniu. Podano przykłady metod wydzielania sacharydów z mleka lub serwatki. Wskazano na biotechnologiczne możliwości doskonalenia ich składu oraz właściwości prozdrowotnych.

Słowa kluczowe: sacharydy mleka • enzymatyczna modyfikacja • prebiotyki

Summary

Based on our studies and available information of selected examples of milk saccharides production methods and their importance in human nutrition were presented. This communication provides an overview on the strategies for separation of saccharides from milk or cheese whey. Attention was also paid to the biotechnological possibility to improve the composition and a health benefits of milk saccharides.

Key words: saccharides • enzymatic modification • prebiotics

Wpłynęło: 26–05-2015

Zaakceptowano: 12-06-2015

Opublikowano on-line: 30-12-2015

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski
Katedra Biotechnologii Żywności,
Wydział Nauki o Żywności,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie
ul. Heweliusza 1, 10-718 Olsztyn
e-mail:
wlodzimierz.bednarski@uwm.edu.pl

Wstęp

Głównym sacharydem mleka jest laktoza. Jej zawartość w mleku krów wynosi 4,4 – 5,2%, a w mleku kobiecym około 7%. Laktoza (4-O-β-galaktopiranozylo-D-glukopiranoza, $C_{12}H_{22}O_{11}$) jest disacharydem zbudowanym z glukozy i galaktozy [12]. W roztworze wodnym laktoza występuje w dwóch formach α i β. Kryształy α-laktozy można otrzymać jako monohydraty po zagęszczeniu wodnego roztworu do stanu przesycenia. Kryształy β-anhydatu są słodsze i lepiej rozpuszczalne niż α-hydraty. W roztworach wodnych obydwie formy, α- i β-laktozy, występują w równowadze. Laktoza jest cukrem słabo rozpuszczalnym w porównaniu do innych znanych disacharydów. Skutkuje to określonymi problemami technologicznymi w produkcji koncentratów mleka, a także lodów [12].

Wiadomo, że spożycie mleka może być ograniczone nietolerancją laktozy przez konsumentów pozbawionych aktywnej β-galaktozydazy w przewodzie pokarmowym. Jest to szczególnie ważne w żywieniu niemowląt. W dążeniu do wyeliminowania tych niedogodności opracowano technologie produkcji mleka bezlaktozowego lub z obniżoną zawartością laktozy. Dominującą metodą jest enzymatyczna hydroliza laktozy w mleku. Stosuje się ją także w procesie hydrolizy cukru mlekowego w serwatce lub permeatach po ultrafiltracji mleka lub serwatki. Można w ten sposób otrzymać koncentraty cukrowe o korzystnych właściwościach fizyko-chemicznych i zdrowotnych [1, 2, 4, 12, 16, 19,20].

Do interesujących procedur biotechnologicznych zaliczyć można otrzymywanie preparatów galaktooligosacharydów, laktulozy lub laktosacharozy [1, 12, 13]. Wzrastające zainteresowanie oligosacharydami jako prozdrowotnymi składnikami żywności funkcjonalnej uzasadnia przybliżenie wiedzy o ich występowaniu w mleku, a także o kierunkach enzymatycznej modyfikacji laktozy.

Wskazana problematyka jest treścią niniejszego artykułu.

Charakterystyka rodzimych oligosacharydów mleka

Obecność oligosacharydów w mleku jest szczególnie ważne w żywieniu niemowląt. Dotyczy to zarówno mleka kobiecego, jak i krowiego [5, 15]. W zależności od okresu laktacji jeden litr mleka kobiecego zawiera od 5 do 15 gramów oligosacharydów. Ich skład współtworzą: D-glukoza, D-galaktoza, N-acetylglukozamina, L-fukoza i kwas sialowy. Struktura chemiczna oligosacharydów jest złożona [15]. W ich składzie występują różne wiązania glukozylowe. Konsekwencją tego jest ponad 200 izomerów, z różnym stopniem polimeryzacji (od DP3 do DP20). W większości z nich występuje laktoza. Galaktoza w laktozie może być sializowana w pozycji α-(2,3) i/lub α-(2,6). Laktoza może być również połączona z fukozą. Te trisacharydy nazywane są krótkołańcuchowymi oligosacharydami. Obecnie wiadomo, że są one preferencyjnie wykorzystywane przez niemowlęta w początkowym okresie żywienia [15, 23]. Ogólnie znane prozdrowotne właściwości oligosacharydów wskazują na potrzeby opracowania technologii ich odzysku/wydzielania z mleka lub z serwatki. Oczywiście trudno je produkować w większej skali, stosując jako surowiec mleko kobiece. Uzasadnione jest więc stosowanie w tym celu mleka krów, kóz lub owiec, mimo zdecydowanie mniejszej zawartości oligosacharydów. Znane są procedury technologiczne wydzielania oligosacharydów z serwatki po produkcji serów z mleka koziego [6]. Zastosowano w tym celu techniki membranowe: ultrafiltrację i nanofiltrację. Otrzymany koncentrat pozbawiony soli mineralnych zawierał ponad 80% rodzimych oligosacharydów mleka [15, 20]. Znana jest także metoda otrzymywania i enzymatycznej modyfikacji sialyloligosacharydów wydzielonych z serwatki po produkcji serów z mleka krowiego [10, 11, 15]. We wspomnianym procesie modyfikacji zastosowano α-2,3-trans-sialidazy [15]. Procesy enzymatyczne stosowane są również w produkcji krótkołańcuchowych oligosacharydów, np. sialyllaktozy. Zastosowano w tym celu sialyltransferazę syntetyzowaną przez rekombinanta *E. coli*. Otrzymano go po ekspresji genu α-2,3-sialyltransferazy z *Neisseria gonorrhoeae*. Wydajność syntezy enzymu wyniosła 33 g · l^{-1}. W syntezie sialyllaktozy oraz kompleksu sialylowanych oligosacharydów zastosowano również całe rekombinowane komórki *E. coli* [11]. W ciągłym procesie w zasilanym roztworze laktozy otrzymano 25 g · l^{-1} sialyllaktozy [15].

Innym przykładem procesu syntezy enzymatycznej oligosacharydów jest otrzymanie 2-fukosyllaktozy z zastosowaniem α-1,2-fukozyltransferazy z *Helicobacter pylori*. Kilkanaście innych laktooligosacharydów zawierających fukozę otrzymuje się z udziałem rekombinanta *E. coli*. Potwierdzeniem tych możliwości są wyniki badań Drouillarda i innych [9], którzy w ustalonych warunkach środowiska z glukozą i laktozą otrzymali 3 g · l^{-1} mieszaniny oligosacharydów, w tym 57% fukozyllaktozy.

Enzymatyczna synteza galaktooligosacharydów

Galaktooligosacharydy (GOS) stanowią interesującą pod względem właściwości grupą oligosacharydów [8]. Są one rozpuszczalne we wodzie, tolerancyjne na oddziaływanie środowiska wysokiej kwasowości (niska wartość pH), mało słodkie i niskokaloryczne. Nie ulegają trawieniu w jelicie cienkim i w postaci niezmienionej trafiają do jelita grubego. Zawartość GOS w mleku kobiecym wynosi 5 – 8 g · l^{-1} i jest około 20-krotnie większe niż w mleku znanych ssaków [20].

Syntezę GOS w skali przemysłowej przeprowadza się w procesie enzymatycznej transgalaktozylacji, czyli reakcji, której w określonych warunkach towarzyszy hydroliza laktozy, katalizowana przez β-galaktozydazę (E.C.3.2.1.23) [13, 16, 21]. Komercyjnie dostępne preparaty β-galaktozydazy są produkowane w procesie mikrobiologicznej biosyntezy. Stosuje się w tym celu wyselekcjonowane szczepy bakterii, drożdży lub grzybów pleśniowych. W zależności od źródła pozyskiwania preparaty enzymatyczne wykazują różne

właściwości biokatalityczne zależne od warunków takich jak; kwasowość i temperatura. Istnieją więc możliwość doboru enzymu do hydrolizy/modyfikacji laktozy w mleku, serwatce po produkcji serów lub twarogów. Szczegółową charakterystykę właściwości preparatów β-galaktozydazy przedstawiono w opracowaniu Otieno [21]. Schemat reakcji enzymatycznych występujących w otrzymywaniu GOS można przedstawić następująco:

Hydroliza laktozy

$$Lak. + E \rightarrow \underbrace{Lak. - E}_{kompleks} \rightarrow Glu. + Gal.$$

Transgalaktozylacja

a) cukier jako akceptor - synteza oligosacharydów:

$$Gal. + E \rightarrow \underbrace{Gal. - E}_{kompleks} \xrightarrow{+\,laktoza} \underbrace{Gal. - laktoza}_{oligosacharydy} + E$$

b) woda jako akceptor - uwalnianie galaktozy:

$$Gal. + E \rightarrow \underbrace{Gal. - E}_{kompleks} \xrightarrow{+\,H_2O} Gal. + E$$

Lak., E., Glu., Gal. - laktoza, enzym, glukoza, galaktoza

Wydajność procesu enzymatycznej transgalaktozylacji zależy między innymi od: temperatury, początkowego stężenia laktozy, a także od źródła enzymu i czasu reakcji [1, 2, 3]. Większość stosowanych w tym celu enzymów wykazuje optymalną aktywność w temperaturze 35 - 40°. Znane są również preparaty termostabilne, np. z *Sulfolobus salfatarins*, które katalizują reakcje w środowisku o temperaturze 80 - 90°C. Daje to szanse prowadzenia procesu przy stężeniu laktozy około 80% i uzyskanie wydajności syntezy GOS w granicach 90%, tj. znacznie wyższej niż w procesie prowadzonym w temperaturze 30 - 40°C, głównie z uwagi na zależność rozpuszczalności laktozy od temperatury i związane z tym różnice w jej koncentracji w środowisku reakcji [18]. Zależność wydajności reakcji transgalaktozylacji laktozy od jej zawartości w roztworze potwierdzono w badaniach własnych [1, 2]. Wydajność syntezy GOS oraz ich skład w dużym stopniu zależy od czasu reakcji. Na przykład udział tri- i tetrasacharydów osiąga swoje maksimum już po 30 minutach reakcji, a następnie zaczyna stopniowo spadać [2]. Należy zaznaczyć, że monosacharydy jako produkty hydrolizy laktozy, tj. glukoza i galaktoza, mogą oddziaływać hamująco na przebieg reakcji syntezy GOS [2].

W przemysłowej produkcji GOS, a także w produkcji mleka bezlaktozowego, ważna jest forma enzymu. Obecnie preferowane jest stosowanie preparatów β-galaktozydazy immobilizowanej na określonych nośnikach. Są one bardziej stabilne, można je wykorzystywać wielokrotnie. Większa jest również wydajność procesu i mniejsze koszty produkcji GOS [17].

Ważnym czynnikiem decydującym o atrakcyjności handlowej preparatów GOS jest ich czystość, tj. pozbawienie monosacharydów (glukozy, galaktozy) oraz pozostałości laktozy. Skuteczne jest stosowanie w tym celu technik membranowych [16, 17]. Proces enzymatycznej modyfikacji laktozy z udziałem β-galaktozydazy stosuje się zarówno w mleku, jak i serwatce lub maślance [7, 19]. Dobrym surowcem do syntezy GOS są permeaty po ultrafiltracji mleka lub serwatki. Reakcje prowadzi się w zatężonym roztworze permeatu, z możliwością uzyskania wydajności syntezy GOS w graniach 25% [1, 2]. Otrzymany koncentrat zawierający prebiotyczne oligosacharydy może być stosowany w produkcji napojów fermentowanych z udziałem bakterii probiotycznych.

Enzymatyczne otrzymywanie laktulozy

Laktuloza (4-O-D-galaktopiranozylo-D-fruktoza) jest disacharydem otrzymywanym po izomeryzacji laktozy. Jest ona 1,5-razy słodsza od laktozy oraz dobrze rozpuszczalna w wodzie. Preparaty laktulozy stosowane są w leczeniu ostrych i przewlekłych zaparć. Jej konsumpcja poprawia wchłanianie wapnia, zapobiega powstawaniu tzw. wtórnych kwasów żółciowych, pozytywnie wpływa na aktywność układu odpornościowego [1, 2, 24].

Żywieniowo atrakcyjne właściwości laktulozy uzasadniają kierunki jej stosowania w produkcji żywności funkcjonalnej. Jest ona stosowana jako zamiennik sacharozy w wyrobach cukierniczych, napojach, produktach piekarskich, jogurtach, deserach mlecznych itp. Może być również stosowana jako słodzik dla diabetyków [24].

W skali przemysłowej laktulozę produkuje się metodą chemicznej izomeryzacji laktozy w środowisku alkalicznym. Alternatywą jest bardziej bezpieczna (ze względu na lepszą jakość) metoda enzymatyczna, umożliwiająca izomeryzację laktozy do laktulozy z zastosowaniem glikozylotransferaz i glikozydaz. Proces uwzględnia omówione wcześniej wymagania reakcji transgalaktozylacji [14].

Wydajność syntezy laktulozy zależy głownie od:

- specyficzności stosowanych enzymów,
- stężenia laktozy, która jest donorem galaktozylowej cząsteczki,
- stężenia fruktozy, jako nukleofilowego akceptora.

W ustalaniu warunków otrzymywania laktulozy ważny jest zatem dobór preparatów β-galaktozydazy, stężenie substratów i ich właściwy stosunek [1, 2, 14]. Korzystną wydajność procesu otrzymywania laktulozy można uzyskać prowadząc reakcję w roztworze zawierającym 45% sacharydów, przy proporcji laktozy do fruktozy 2:1 [18]. W Katedrze Biotechnologii Żywności UWM w Olsztynie opracowano metodę enzymatycznego pozyskiwania prebiotycznych oligosacharydów, w tym laktulozy.

Sposób został opatentowany w UP RP. Patent Nr 214118. Jego oryginalność polega między innymi na tym, że do środowiska reakcji wprowadza się miód jako źródło fruktozy.

Otrzymywanie laktosacharozy

Laktosacharoza jest trisacharydem otrzymywanym po transfruktozylacji laktozy. Jej słodkość jest mniejsza od sacharozy (0,3 – 0,6) [12]. Zaliczana jest do grupy sacharydów wywołujących efekty bifidogeniczne u konsumentów, tj. obniża pH kału, hamuje rozwój bakterii patogennych w jelicie grubym, stymuluje rozwój bakterii probiotycznych. W procesie transfruktozylacji laktozy stosowane są bakteryjne lub grzybowe fruktozyltransferazy [22]. Donorem fruktozy tej reakcji może być sacharoza lub rafinoza. Produkcja przemysłowa jest mało upowszechniona w Europie. Wiadomo, że jest produkowana w Japonii [12].

Podsumowanie

W oparciu o dostępne informacje literaturowe oraz o wyniki badań własnych przedstawiono aktualną wiedzę o sacharydach mleka, a także o kierunkach ich enzymatycznej modyfikacji. Szczególną uwagę zwrócono na stosowane w tym celu procedury biotechnologiczne. Wskazano także na mało znane prozdrowotne właściwości rodzimych sacharydów mleka, jak również produktów ich enzymatycznej modyfikacji.

Upowszechnieniu tych procedur w skali przemysłowej sprzyja postęp dotyczący genetycznego doskonalenia cech technologicznych drobnoustrojów syntetyzujących enzymy niezbędne w omawianych procesach. Daje to szanse obniżenia kosztów ich produkcji i ekonomicznej atrakcyjności stosowania w modyfikacji składników mleka.

Warto zaznaczyć, że wskazane metody wydzielania i modyfikacji sacharydów mleka należy łączyć z nowymi możliwościami przetwarzania serwatki lub permeatów po ultrafiltracji mleka lub serwatki.

Literatura:

1. Adamczak M., Bednarski W. Enzymatyczna synteza galaktooligosacharydów i laktozy w permeacie po ultrafiltracji serwatki. Żywność, Nauka, Technologia, Jakość, 2008, 6(61), 105-117.
2. Adamczak M., Cherubin D., Bednarski W. Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. Chem. Pap., 2009, 63(2), 111-116.
3. Bednarski W., Kulikowska A. Influence of two-phase system composition on biocatalytic properties of *β*-galactosidase preparations. Chem. Pap., 2007, 61(5), 364-369.
4. Barile D., Tao N., Lebrilla C.B., Coisson J.-D., Arlorio M., German J.B. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. Int. Dairy J., 2009, 19, 524-530.
5. Barile D., Rastall R.A. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. Curr. Opin. Chem. Biol., 2013, 24, 214-219.
6. Claps S., Di Napoli M.A., Sepe L., Caputo A.R., Rufrano D., Di Trana A., Annicchiarico G., Fedele V. Sialyloligosaccharides content in colostrum and milk of two goat breeds. Small Rumin. Res., 2014, 121, 116-119.
7. Čurda L., Rudolforvá J., Štětina J., Dryák B. Dried buttermilk containing galactooligosaccharides—process layout and its verification. J. Food Eng., 2006, 77, 468-471.
8. Demczuk A., Bednarski W., Kowalewska-Piątas J. Aspekty technologiczne i żywieniowe enzymatycznego wzbogacania mleka i jego przetworów w galaktooligosacharydy. Biotechnologia, 2007, 3(66), 153-165.
9. Drouillard S., Driguez H., Samain E. Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing *Helicobacter pylori* alpha1,2-fucosyltransferase in metabolically engineered *Escherichia coli* cells. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2006, 118, 1810-1812.
10. Endo T., Koizumi S., Tabata K., Kakita K., Ozaki A. *Large-scale production* of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling. Appl. Microbial. Biotechnol., 2000, 53, 257-261.
11. Fierfort T., Samain E. Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides. J. Biotechnol., 2008, 134, 261-265.
12. Gänzle M.G., Haase G., Jelen P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. Int. Dairy J., 2008, 18, 685-694.
13. Gänzle M.G. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. Int. Dairy J., 2012, 22, 116-122.
14. Guerrero C., Vera C., Plou F., Illanes A. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β-galactosidases. J. Mol. Catal. B Enzym., 2011, 72, 206-212.
15. Han N.S., Kim T.J., Park Y.C., Kim J., Seo J.H. Biotechnological production of human milk oligosaccharides. Biotechnol. Adv., 2012, 30, 1268-1278.
16. Harju M., Kallioinen H., Tossavainen O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. Int. Dairy J., 2012, 22, 104-109.
17. Huerta L.M., Vera C., Guerrero C., Wilson L., Illanes A. Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β-galactosidases from *Aspergillus oryzae.* Process Biochem., 2011, 46, 245-252.
18. Kim Y.-S., Park C.-S., Oh D.-K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus.* Enzyme Microb. Tech., 2006, 39, 903-908.
19. Lisboa C.R., Martinez L.S., Trindade R.A., Costa F.A.A., Burkert J.F.M., Burkert C.A.V. Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey. Food Sci. Biotechnol., 2012, 21(6), 1519-1524.
20. Martinez-Ferez A., Rudloff S., Guadix A., Henkel C.A., Pohlentz G., Boza J., Guadix M.E., Kunz C. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. Int. Dairy J., 2006, 16, 173-181.
21. Otieno D.,O. Synthesis of β-galactooligosaccharides from lactose using microbial β-galactosidases. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2010, 9, 471-482.
22. Palcic M.M. Glycosyltransferases as biocatalysts. Curr. Opin. Chem. Biol., 2011, 15, 226-233.
23. Sela D.A. Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides. Int. J. Food Microbiol., 2011, 149, 58-64.
24. Schuster-Wolff-Bühring R., Fischer L., Hinrichs J. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. Int. Dairy J., 2010, 20, 731-741.