

*Magdalena Wirkowska, Joanna Bryś, Agata Górską, Ewa Ostrowska – Ligęza,  
Katarzyna Żubrzycka*

## WZBOGACANIE TŁUSZCZU MLECZNEGO W KWASY n-3 NA DRODZE PRZEESTRYFIKOWANIA ENZYMATYCZNEGO

Zakład Chemii Żywności, Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna  
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik Zakładu: dr hab. P. Koczoń

*Tłuszcz mleczny i koncentrat kwasów n-3 poddano przeestryfikowaniu enzymatycznemu z zastosowaniem preparatu Lipozyme RM IM. Oznaczono skład i rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w surowcach wyjściowych i produktach przeestryfikowania. W wyniku modyfikacji nastąpiło wbudowanie długocząsteczkowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w pozycje zewnętrzne triacylogliceroli. Stwierdzono również obecność kwasów pochodzących z tłuszczu mlecznego oraz z koncentratu kwasów n-3. Przeestryfikowanie z zastosowaniem lipazy specyficznej w stosunku do wiązań estrowych w pozycji sn-1, 3 jest skuteczną metodą wzbogacania tłuszczu mlecznego w kwasy z szeregu n-3.*

Hasła kluczowe: przeestryfikowanie enzymatyczne, tłuszcz mleczny, kwasy n-3  
Keywords: enzymatic interesterification, milkfat, n-3 fatty acids

Jedną z metod modyfikacji tłuszczów, która oferuje potencjalnie największe możliwości jest przeestryfikowanie enzymatyczne. W wyniku tej reakcji można doprowadzić do zmiany sposobu rozkładu kwasów tłuszczowych w triacyloglicerolach, natomiast biologicznie aktywne kwasy tłuszczowe pozostaną nienaruszone (1). Dzięki tej metodzie można uzyskać nowe triacyloglicerole w łagodnych warunkach, bez strat cennych składników oraz bez szkodliwych produktów ubocznych. Wykorzystanie lipaz w procesie przeestryfikowania, zwłaszcza tych, które wykazują różną specyficzność w stosunku do położenia wiązania estrowego w cząsteczkach triacylogliceroli, pozwala na uzyskanie produktów o z góry założonej strukturze (2). Jednym z tłuszczów poddawanych modyfikacjom jest tłuszcz mleczny. Zajmuje on ważne miejsce w żywieniu człowieka. Charakterystyczny skład i rozkład kwasów tłuszczowych tłuszczu mlecznego sprawia, że jest dobrze przyswajalny przez organizm ludzki, w tym także, przez niemowlęta i małe dzieci.

Celem pracy było wzbogacanie tłuszczu mlecznego w kwasy tłuszczowe z szeregu n-3 na drodze przeestryfikowania enzymatycznego.

## MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań był tłuszcz mleczny (MF), tłuszcz zawierający koncentrat kwasów n-3 (ROPUFA) oraz mieszaniny wyżej wymienionych tłuszczów o składzie wagowym 1:1, które poddano przeestryfikowaniu enzymatycznemu. Wykorzystano preparat Lipozyme RM IM, zawierający immobilizowaną lipazę, specyficzną w stosunku do wiązań estrowych w pozycji *sn*-1, 3 triacylogliceroli. Przeestryfikowanie było prowadzone w temp. 50 i 80°C, przez 2 i 8 h. Preparat był dozowany na poziomie 8% w stosunku do masy mieszaniny. W triacyloglicerolach wyizolowanych z surowców wyjściowych i produktów przeestryfikowania oznaczono skład kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej na podstawie PN-EN ISO 5508 wykorzystując kolumnę kapilarną InterCap Pure WAX o następujących parametrach: średnica wewnętrzna 0,32 mm, długość 60 m, grubość filmu 0,25 µm. Badania wykonano w trzech równoległych powtórzeniach. Oznaczono również udział kwasów tłuszczowych w pozycji *sn*-2 triacylogliceroli metodą *Brockerhoff'a* (3).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tłuszczu mlecznym kwasem występującym w największej ilości był kwas palmitynowy, jego zawartość wyniosła 40,9% (Tab.1). Obok kwasu palmitynowego w znacznej ilości występowały kwas oleinowy - 20,1%, mirystynowy - 13,2% oraz stearynowy - 9,5%. Tłuszcz mleczny w porównaniu z pozostałymi tłuszczami jadalnymi zawiera najwięcej kwasów tłuszczowych nasyconych. Wśród nasyconych kwasów tłuszczowych, 25% stanowią kwasy krótko- i średniołańcuchowe, które nie powodują otyłości ani hipercholesterolemii. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe są bardzo łatwo przyswajalne, są szybkim źródłem energii i nie obciążają wątroby (4, 5). W drugim analizowanym surowcu, tłuszczu zawierającym koncentrat kwasów n-3, jednonienasycone kwasy stanowiły 38,4%, wielonienasycone oraz nasycone wystąpiły w ilości odpowiednio 30,3% oraz 31,2%. W preparacie ROPUFA zawartość dwóch najważniejszych kwasów tłuszczowych dokozaheksaenowego oraz eikozapentaenowego wyniosła odpowiednio 16,9% oraz 9,3% (Tab.1). Kwasy te obniżają poziom triacylogliceroli, hamują rozwój chorób układu krążenia, odgrywają ważną rolę we wzroście młodego organizmu oraz w prawidłowym funkcjonowaniu narządu wzroku i rozwoju układu nerwowego niemowląt (6, 7). W produktach przeestryfikowania stwierdzono obecność kwasów pochodzących zarówno z tłuszczu mlecznego, jak i koncentratu n-3 (ROPUFA), w tym kwasów krótkołańcuchowych oraz kwasów należących do szeregu n-3 - EPA i DHA (Tab.1). Najniższą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych charakteryzowała się mieszanina przeestryfikowana przez 8 godzin w 80°C (15,1%), a najwyższą mieszanina przeestryfikowana w 50°C (16,1%). Nie zmieniła się ilość izomerów trans kwasów tłuszczowych (TFA). Obecność izomerów trans na poziomie 0,8-1,4% w uzyskanych mieszaninach wynika z naturalnej obecności tych kwasów w tłuszczu mlecznym.

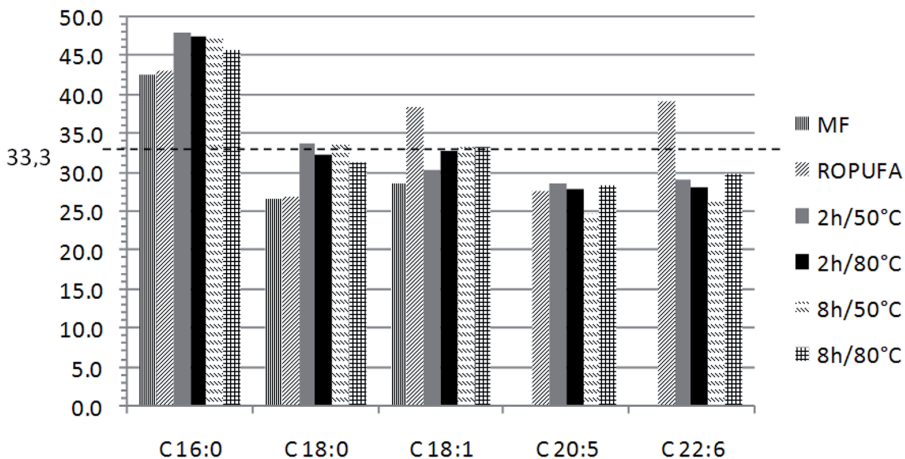
Tabela 1. Skład kwasów tłuszczowych surowców wyjściowych oraz produktów przeestryfikowania

Table 1. Fatty acids composition in starting materials and interesterified fat

Wzór kwa- su tłuszczo- wego	MF	ROPUFA	2h/50°C	2h/80°C	8h/50°C	8h/80°C
C4:0	0,6±0,09	-	0,2±0,08	0,2±0,07	0,3±0,07	0,2±0,05
C6:0	0,8±0,10	-	0,3±0,07	0,2±0,06	0,3±0,05	0,3±0,06
C8:0	0,9±0,15	-	0,3±0,08	0,3±0,10	0,3±0,06	0,3±0,06
C10:0	2,1±0,20	-	0,9±0,10	0,9±0,23	1,0±0,10	1,0±0,08
C12:0	3,2±0,24	-	1,5±0,36	1,5±0,17	1,6±0,10	1,6±0,24
C14:0	13,2±0,97	5,2±0,53	8,7±0,73	8,7±0,58	8,7±0,43	9,0±0,49
C14:1c	0,8±0,21	-	0,6±0,15	0,6±0,10	0,6±0,21	0,6±0,10
C15:0	1,3±0,27	0,7±0,21	1,2±0,07	1,2±0,36	1,2±0,11	1,2±0,12
C 15:1	0,2±0,06	-	-	-	-	-
C16:0	40,9±1,34	17,1±0,87	27,2±2,10	27,5±0,93	27,4±0,89	27,9±0,99
C16:1c	1,2±0,19	4,9±0,48	3,4±0,21	3,5±0,43	3,4±0,21	3,4±0,23
C17:0	0,6±0,22	1,2±0,24	1,1±0,06	1,1±0,14	1,1±0,07	1,1±0,10
C17:1c	0,3±0,05	0,7±0,10	0,5±0,03	0,6±0,08	0,5±0,04	0,5±0,07
C18:0	9,5±0,27	4,2±0,32	7,7±0,23	7,8±0,25	7,6±0,35	7,9±0,46
C18:1t	1,7±0,31	-	1,4±0,37	1,4±0,21	0,8±0,10	1,0±0,08
C18:1c	20,1±0,76	21,7±1,03	23,4±1,79	23,4±0,95	23,3±0,8	23,4±0,83
C 18:2 t	0,1±0,04	-	-	-	-	-
C18:2c	1,4±0,10	2,4±0,09	2,2±0,41	2,1±0,15	2,3±0,14	2,1±0,21
C18:3n-3	0,5±0,04	0,9±0,05	0,7±0,10	0,7±0,12	0,8±0,08	0,7±0,10
C20:0	0,5±0,05	1,5±0,10	1,2±0,21	1,1±0,16	1,2±0,12	1,2±0,12
C20:1c	0,1±0,03	6,2±0,23	3,2±0,43	3,2±0,27	3,4±0,24	3,0±0,34
C 20:4	-	0,9±0,04	-	-	-	-
C 22:0	-	1,2±0,12	-	-	-	-
C20:5n-3	-	9,3±0,87	5,0±0,31	4,9±0,28	5,0±0,52	4,6±0,38
C22:1c	-	2,5±0,37	1,3±0,11	1,3±0,12	1,2±0,18	1,3±0,14
C 24:1	-	2,4±0,30	-	-	-	-
C22:6n-3	-	16,9±0,95	8,1±0,33	7,8±0,28	8,1±0,51	7,6±0,47
ΣSFA	73,6±3,90	31,1±2,39	50,3±4,09	50,0±3,05	50,7±2,35	51,7±2,77
ΣMUFA	22,6±1,30	38,4±2,51	32,4±2,72	32,6±1,95	32,4±1,68	32,2±1,71
ΣPUFA	1,9±0,14	30,4±2,00	16,0±1,15	15,5±0,83	16,2±1,25	15,0±1,16

Właściwości tłuszczów zależą nie tylko od składu kwasów tłuszczowych, ale także od struktury triacylogliceroli. Istotny wydaje się związek pomiędzy rozmieszczeniem stereospecyficznym kwasów tłuszczowych, a ich metabolizmem w organi-

zmie człowieka (8). Podczas trawienia w przewodzie pokarmowym silnie specyficzna wobec pozycji *sn*-1,3 lipaza trzustkowa katalizuje powstawanie *sn*-2 monoacylogliceroli oraz wolnych kwasów tłuszczowych, które są wchłaniane w jelicie cienkim. *Sn*-2 monoacyloglicerole, podlegają acydolizie i są transportowane przez chylmiki. Kwasy tłuszczowe uwolnione z pozycji *sn*-1,3 mają inny szlak metaboliczny. Krótko- i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą zostać rozpuszczone w wodnej fazie treści jelita, gdzie są wchłaniane, wiązane do albumin i transportowane do wątroby przez żyłę wrotną (8). Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (palmitynowy, stearynowy) mają niskie współczynniki absorpcji ze względu na temperaturę topnienia wyższą niż temperatura organizmu ludzkiego oraz zdolność do tworzenia mydeł wapniowych (9). W tłuszczu mlecznym kwas palmitynowy umiejscowiony jest głównie w pozycji *sn*-2 triacylogliceroli (Ryc.1), co powoduje, że tłuszcz ten jest dobrze przyswajalny przez organizm dziecka. Natomiast kwas oleinowy jest w przeważającej ilości zestyfikowany w pozycjach zewnętrznych *sn*-1,3.



Ryc. 1 Ilość wybranych kwasów tłuszczowych w pozycji *sn*-2 w surowcach wyjściowych oraz produktach przeestyfikowania

Fig. 1 The contribution of individual fatty acids in the internal position (*sn*-2) in starting materials and interesterified fat

We wszystkich otrzymanych przeestyfikowanych mieszaninach kwas palmitynowy był zestyfikowany głównie w pozycjach wewnętrznych. Udział tego kwasu w pozycji *sn*-2 wahał się od 45,9% do 47,9%. W najmniejszych ilościach w pozycji *sn*-2 wystąpiły długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe (Ryc. 1). Oznacza to, że kwasy EPA i DHA wbudowały się w pozycje zewnętrzne triacylogliceroli. Wydłużenie czasu przeestyfikowania nie spowodowało zwiększenia udziału tych kwasów w pozycjach *sn*-1,3 triacylogliceroli.

Dawniej, standardowe odżywki, które wytworzone zostały przy użyciu olejów roślinnych nie zawierały kwasu DHA oraz mimo dużej zawartości kwasu palmityno-

wego w pokarmie, u niemowląt stwierdzono niską absorpcję tłuszczu oraz wapnia z pożywienia (9).

Uzyskany rozkład kwasów tłuszczowych, gdzie kwas nasycony, palmitynowy umiejscowiony jest w pozycji wewnętrznej, a kwasy nienasycone w pozycjach zewnętrznych sprawia, że otrzymane tłuszcze charakteryzują się lepszą wartością odżywczą i mogą być lepiej przyswajalne np. przez organizm dziecka, w związku z tym tłuszcze te mogą być wykorzystywane w wytwarzaniu produktów dla niemowląt i małych dzieci. Specyficzna dystrybucja kwasów w otrzymanych tłuszczach pozwoli na uzyskanie odpowiednich produktów procesu trawienia w organizmie dziecka. W wyniku metabolizmu będzie powstawał *sn*-2 monopalmitynian glicerolu, który jest bardzo dobrze wchłaniany przez organizm dziecka. Uwalniane w wyniku hydrolizy długołańcuchowe nienasycone kwasy tłuszczowe oraz ich sole wapniowe są dobrze wchłaniane w organizmie dziecka (10).

## WNIOSKI

1. Przeestryfikowanie z zastosowaniem lipazy specyficznej w stosunku do wiązań estrowych w pozycji *sn*-1, 3 jest skuteczną metodą wzbogacania tłuszczu mlecznego w kwasy z szeregu n-3.

2. Produkty przeestryfikowania zawierają kwasy tłuszczowe pochodzące zarówno z tłuszczu mlecznego jak i preparatu ROPUFA.

3. W wyniku enzymatycznej modyfikacji nastąpiło wbudowanie długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w pozycje zewnętrzne *sn*-1, 3 triacyloglicerolu.

M. Wirkowska, J. Bryś, A. Górską,  
E. Ostrowska – Ligęza, K. Żubrzycka

ENRICHMENT OF MILKFAT IN n-3 FATTY ACIDS BY ENZYMATIC INTERESTERIFICATION

### Summary

Milkfat and n-3 fatty acids in form their concentrates was interestefied using enzymatic preparation Lipozyme RM IM. Composition and distribution of fatty acids in starting materials and interesterified fats were determined. As a result of the modification was incorporating long chain polyunsaturated fatty acids in the external positions of triacylglycerols. In interesterified blends were found fatty acids derived from both the milkfat and concentrates of n-3 fatty acids.

## PIŚMIENNICTWO

1. Jeyarani T., Yella Redy S.: Effect of enzymatic interesterification on physicochemical properties of mahua oil and kokum fat blend. Food Chem. 2010; 123(2): 249-253.-2. Tarnowska K., Bryś J., Kostecka M., Wirkowska M., Kowalski B.: Wpływ ilości wody w katalizatorze na właściwości przeestryfikowanych mieszanin łożu wołowego i oleju rzepakowego. Bromat. Chem. Toksykol., 2009; 3: 339-343.-3. Brockerhoff H.: A stereospecific analysis of triglycerides. J. Lipid Res., 1965; 6: 10 – 15.-4. Cichosz G.: Tłuszcz mlekowy – fakty i mity cz. 1. Przegląd Mleczarski, 2009; 11: 4-9.-5. Cichosz G.: Tłuszcz mlekowy –

fakty i mity cz. 2. Przegląd Mleczarski, 2009; 12: 14-17.-6. *Gulati S.K., May C., Wynn. P.C., Scott T.W.*: Milk fat enriched in n-3 fatty acids. *Animal Feed Sci. Technol.*, 2002; 98: 143-152.-7. *Kolanowski W.*: Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega 3 – znaczenie zdrowotne w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2007; 3: 229-237.-8. *Hunter J.E.*: Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids*, 2001; 7 (36): 655-668.-9. *Lopez-Lopez A., Castellote-Bargalló A.I., Campoy-Folgoso C., Rivero-Urgel M., Lopez-Sabater M.C.*: Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and infant formulas. *Eur. J. Clinic. Nutr.*, 2002; 56: 1242-1254.-10. *López-López A., Castellote-Bargalló A.I., Campoy-Folgoso C., Rivero-Urgel M., Tormo-Carnicé R., Infante-Pina D., López-Sabater M.C.*: The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces. *Early Hum. Develop.*, 2001; 65: 83-94.

Adres: ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Badania były finansowane ze środków budżetowych na naukę w latach 2010-2012 jako projekt badawczy nr N N312 068439