

ОПТИМИЗАЦИЯ ИЗОМЕРИЗАЦИИ ЛАКТОЗЫ В ЛАКТУЛОЗУ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

*Институт прикладной физики АН Молдовы,
ул. Академией, 5, г. Кишинев, MD-2028, Республика Молдова, mbologa@phys.asm.md*

В настоящее время лактулоза – самый эффективный пребиотик, широко используемый как профилактическое и терапевтическое средство при ряде заболеваний (особенно в случаях формирования дисбиотических явлений). Она встречается только в материнском молоке, в то время как в молоке животных основным углеводом является лактоза. Лактулоза впервые (в 1929 г.) синтезирована Е. Montgomery и С.S. Hudson при исследовании структуры дисахаридов путём термообработки лактозы щелочным раствором. В 1945–1948 гг. F. Petuely и J. Cristan выделили из женского молока вещество, активизирующее рост бифидобактерий, и, не зная его строения, определили как бифидус-фактор. И только в 1957 г. F. Petuely определил химическое строение этого фактора как углевода из группы дисахаридов.

Потребителями лактулозы являются предприятия производители продуктов детского и лечебно-диетического питания, а также медицина, которая выпускает более 60 препаратов, созданных на базе лактулозы и основанных на её свойстве, как мощного бифидогенного фактора - восстанавливать нормальную микрофлору кишечника. Для этих целей лактулозу можно использовать либо в виде сиропов, либо в кристаллической форме.

Самый эффективный путь получения лактулозы – трансформация самого близкого ее изомера – лактозы, которая считается лучшим, но дорогостоящим сырьем. Реакция изомеризации лактозы в лактулозу осуществляется, как известно, из химии углеводов по двум механизмам. Во-первых, в щелочной среде происходит LA-трансформация альдолазы (лактозы) в кетозу (лактулозу) через образование промежуточных енольной формы лактозы и эпилактозы. По второму механизму – перегруппировка Амадори – лактоза взаимодействует с аминами с образованием лактозамина, который затем и подвергается перегруппировке, превращаясь в лактулозилламин, расщепляющийся на лактулозу и исходный амин [1].

Промышленное производство лактозо-лактuloзных сиропов из растворов лактозы основано главным образом на внутримолекулярной перегруппировке лактозы по механизму LA-трансформации в щелочной среде. Анализ литературных данных позволяет выделить три основные группы катализаторов этой реакции. К первой относятся гидроксиды щелочных и щелочноземельных металлов – доступные и недорогие реагенты, позволяющие трансформировать 30% лактозы. К недостаткам этих катализаторов следует отнести высокую скорость образования побочных продуктов реакции. Вторая группа включает сульфиты, фосфиты и другие слабощелочные реагенты, предопределяющие низкую скорость протекания побочных реакций, обеспечивает невысокую степень изомеризации лактозы в лактулозу. В третью группу катализаторов входят высокоэффективные, позволяющие изомеризовать до 80% лактозы, но токсичные и трудноудаляемые алюминаты и бораты [2, 3].

Молочная сыворотка, содержащая почти всю лактозу молока, относится к группе относительно дешевого лактозосодержащего сырья, отвечающего требованиям получения лактулозы. Перспективным способом изомеризации лактозы молочной сыворотки в лактулозу является ее электроактивация, которой было уделено особое внимание на симпозиуме международной молочной федерации, состоявшемся в 2007 г. в Москве. Молочная сыворотка представляет особый интерес как раствор для электрохимических процессов. Имея относительно высокое содержание минеральных веществ, она обладает необходимыми свойствами для быстрого и эффективного накопления активных заряженных частиц при прохождении через нее электрического тока. Известно, что основа электрохимических реакций – разложение воды и диссоциирующих веществ. Образующиеся в католите гидроксид ионы играют роль акцепторов протонов в реакции изомеризации лактозы. А избыточная внутренняя потенциальная энергия активированного раствора интенсифицирует реакцию превращения лактозы в лактулозу [1].

Следует отметить, что электроактивация позволяет достичь более высокой степени изомеризации лактозы (в творожной сыворотке – до 32%) по сравнению с использованием щелочных катализаторов (18%). Полученный эффект, вероятно, достигается не только за счет меняющейся под действием электрического поля энергии активации, но и благодаря миграции из католита ионов молочной кислоты, являющейся ингибитором реакции изомеризации [1].

Проведен ряд исследований и разработаны способы увеличения степени изомеризации лактозы при электроактивации. В частности, добавление в обрабатываемую сыворотку 1–5% карбамида интенсифицирует реакцию по второму механизму (перегруппировка Амадори) [1, 4]. Однако известные способы трансформации лактозы путем электроактивации молочной сыворотки позволяют получить концентрат, в котором содержится и углеводная составляющая, обогащенная лактулозой, и фракция белков, что ограничивает его использование. Кроме того, предварительное нагревание сыворотки до температуры выше 55 °C вызывает тепловую денатурацию белков.

Авторами предложен способ электрофизической обработки молочной сыворотки с одновременным получением белково-минерального концентрата (БМК) и остаточной сыворотки (ОС), содержащей инвертированную лактулозу [5, 6]. Однако содержание лактозы в частично депротеинизированной и деминерализованной остаточной сыворотке относительно высокое, и это предопределило продолжение исследований по оптимизации процесса изомеризации оставшейся лактозы. С этой целью проводили поэтапную электроактивацию сыворотки, варьируя состав анодной и катодной жидкости.

Результаты и их обсуждение

Для обработки использовали охлажденную до 8-10 °C творожную сыворотку, очищенную от казеиновой пыли в поле массовых сил. Основными параметрами, регулирующими процессы получения БМК и изомеризации лактозы в лактулозу, являются: плотность электрического тока, состав анодного и катодного растворов, скорость поступления жидкости в камеры, тип мембраны. Сочетание этих факторов определяет степень возрастания температуры и активной кислотности в катодной камере, а также изменение электрического напряжения и состояние мембраны. Процесс электроактивации проводили в два этапа. На первом – исходную молочную сыворотку (ИМС) обрабатывали в катодной камере (КК) диафрагменного электролизера с ионообменной мембраной МК-40 (при плотности тока 0,02 А/см², в стационарном режиме, в течение 30 минут). Анодной жидкостью служил 2% раствор хлористого кальция в дистиллированной воде. Образующийся в виде пены БМК отделяли от ОС в поле массовых сил.

Выбор хлористого кальция для обеспечения, во-первых, электропроводности и, во-вторых – увеличения перехода белка в БМК обусловлен ролью ионов кальция – миграцией в катодную камеру в процессе комплексообразования белков, а также его доступностью и нетоксичностью. Кроме того, получаемый продукт обогащается минеральным компонентом, роль которого в жизнедеятельности организмов широко известна.

Установлено, что наибольший переход белка в БМК (до 65%) наблюдается при 2% хлористого кальция в анодном растворе. При этой концентрации процесс пенообразования активизируется с первых минут обработки, в результате чего формируется более устойчивая пена, что коррелирует с переходом белка в концентрат. Обработка сыворотки в диапазоне температур, не превышающих порог тепловой денатурации белков (55–65 °C), являлась одной из целей исследования, поскольку только в этом случае сохраняется активность аминокислот, участвующих в реакции трансформации лактозы в лактулозу [5].

В БМК, как свидетельствует электрофоретический спектр его белков, присутствуют все белковые фракции ИМС. Это обеспечивает сбалансированность белков БМК по аминокислотному составу, что подтверждают результаты в табл. 1. Отличия содержания отдельных аминокислот в БМК и ИМС показывают, что степень перехода в концентрат основных фракций сывороточных белков не одинакова. В белке концентрата имеются все незаменимые аминокислоты, представленные в стандартном белке – эталоне содержания незаменимых аминокислот в полноценном белке, в основном превышая их содержание.

В табл. 2 приведено количество углеводов в лиофилизированных образцах БМК, отобранных по мере возрастания активной кислотности в катодной камере. Из таблицы видно, что содержание углеводной составляющей меняется не линейно, постепенно увеличиваясь к окончанию процесса. В суммарном лиофилизированном БМК количество углеводов не превышает 2,1%, при этом в концентрат переходит лишь 0,4% от содержащихся в ИМС. Вероятнее всего, их большая часть попадает в БМК вместе с белком на стадии реакции аминирования лактозы активными аминокислотными группами белков. Однако столь малое содержание углеводов не мешает длительному хранению сухого концентрата.

Таблица 1. Аминокислотный состав белков ИМС, БМК и незаменимые аминокислоты стандартного белка (% в белке)

№	Аминокислоты	ИМС	БМК	Стандартный белок
1	Аспарагин	12,39	12,71	
2	Серин	4,58	4,39	
3	Глутамин	17,54	17,31	
4	Пролин	3,81	2,73	
5	Глицин	2,03	2,13	
6	Аланин	4,77	3,77	
7	Гистидин	1,58	1,97	
8	Аргинин	2,32	1,83	
9	Треонин	5,16	5,08	4
10	Валин	5,27	4,86	5
11	Изолейцин	5,10	5,66	4
12	Лейцин	10,38	10,79	7
13	Триптофан	1,91	2,78	1
14	Лизин	9,29	9,54	5,5
15	Фенилаланин	2,94	3,40	
16	Тирозин	3,56	3,83	
	Фенилал.+ тирозин			6
17	Цистин	2,68	3,12	
18	Метионин	1,90	1,09	
	Цистин+ метионин			3,5

Таблица 2. Содержание углеводов по Дюбойсу в БМК, отобранных при разных значениях pH

Время обработки (в мин)	pH	Концентрация углеводов (в %)
5	6,60	0,8
10	7,30	1,29
15	7,75	1,20
20	9,75	2,10
25	10,95	2,54
30	11,25	2,61

На первом этапе электроактивации ИМС изомеризация лактозы в лактулозу осуществляется по двум механизмам: в большей степени – по механизму LA-трансформации за счёт накопления в катодной камере акцепторов протонов, возникающих в результате протекания электрохимических реакций. Кроме того, содержащиеся в сыворотке белковые вещества и амины (свободные аминокислоты, мочевины, мочевая кислота, креатин и др.) могут способствовать реакции – по механизму перегруппировки Амадори. Часть аминов, поступающих в сыворотку в виде свободных аминокислот, образуются при частичном гидролизе белков вследствие первичных технологических процессов переработки молока (получение творога и сыра), а также как продукты жизнедеятельности микроорганизмов, используемых для сбраживания молока.

Амины, участвующие в реакции изомеризации лактозы в лактулозу, по окончании реакции высвобождаются в результате расщепления лактулозиламина. Значительные изменения в процессе обработки содержания в ОС аминсоединений небелковой природы (табл. 3) демонстрируют, какая их часть находится в связанном с углеводным основанием состоянии, то есть в одной из промежуточных форм реакции.

Поскольку условия обработки сыворотки по температуре и активной кислотности, наблюдаемые на первом этапе обработки (рис. 1 и 2), не превышают оптимальных значений для процесса изомеризации лактозы в лактулозу [7, 8] и исключают (или почти полностью исключают) образование побочных продуктов реакции, о степени изомеризации судили по снижению содержания лактозы в ОС. В образцах ОС, полученных при возрастающих значениях pH, а также в сыворотке, отобранной из катодной камеры после обработки, остаточный белок осаждали трихлоруксусной

кислотой и поляриметрически определяли содержание лактозы. Её концентрацию рассчитывали по калибровочной.

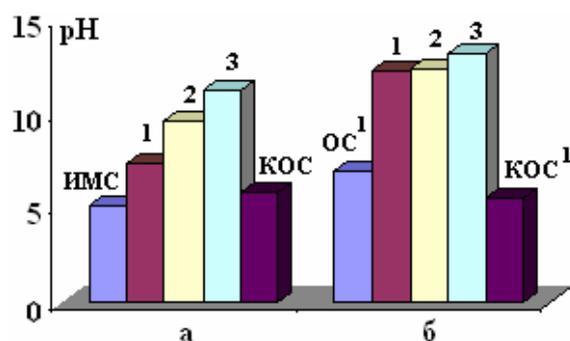


Рис. 1. Изменения рН обрабатываемой сыворотки в процессе электроактивации.

Первый этап обработки (а): катодная жидкость – ИМС, анодная жидкость – 2% хлористый кальций. Второй этап обработки (б): катодная жидкость – 1% карбамид в ОС (ОС¹), анодная жидкость – 1% хлористый кальций. Время обработки, мин: 1 – 10, 2 – 20, 3 – 30

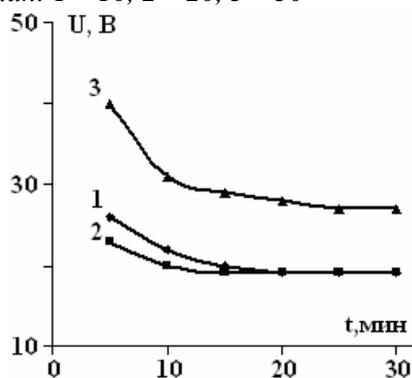
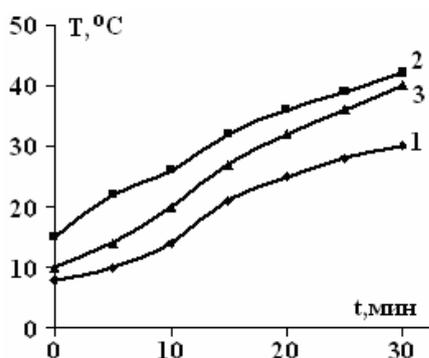


Рис. 2. Изменение температуры обрабатываемой сыворотки в процессе электроактивации

Рис. 3. Изменение напряжения в процессе электроактивации

Первый этап обработки (1): катодная жидкость – ИМС, анодная жидкость – 2% хлористый кальций. Второй этап обработки (2): катодная жидкость – 1% карбамид в ОС (ОС¹), анодная жидкость – 1% хлористый кальций. (3): катодная жидкость – 1% карбамид в ОС (ОС¹), анодная жидкость – 0,5% хлористый кальций.

Таблица 3. Содержание небелковых азотистых веществ в обрабатываемой (остаточной) сыворотке

Время обработки (в мин)	рН	Мочевина, mg/%	Креатин+креатинин, mg/%	Мочевая кислота, mg/%
0 (ИМС)	5,05	11,03	5,98	1,15
5	6,60	7,41	4,01	0,36
10	7,30	6,52	3,56	0,18
15	7,75	6,07	3,47	0,11
20	9,75	6,05	5,15	0,90
25	10,95	3,38	5,85	0,35
30	11,25	1,91	4,85	0,04

Значительное снижение количества лактозы в обрабатываемой сыворотке наблюдается при возрастании рН выше 9,5 (рис. 4,а). Её концентрация в суммарном объёме образцов ОС и катодной остаточной сыворотки (КОС) составляет порядка 40% от ИМС. Отсутствие характерных признаков побочных продуктов изомеризации позволяет предположить, что около 60% лактозы сыворотки трансформируется в лактулозу.

В полученную после первого этапа электроактивации частично депротеинизированную и деминерализованную ОС с активной кислотностью 7, содержащую 40% лактозы и 35–40% белка сыворотки, добавляли 1% карбамид (ОС¹) и повторно обрабатывали в КК. Внесение карбамида в ОС,

в которой содержание аминов значительно снижалось по сравнению с ИМС, обеспечивает осуществление реакции изомеризации лактозы в лактулозу по механизму перегруппировки Амандори наряду с реакцией по типу LA-трансформации. В одном варианте в качестве анодной жидкости использовали 0,5%, в другом – 1% раствор хлористого кальция. Концентрацию хлористого кальция в анодном растворе на втором этапе обработки снизили в связи с обогащением ОС ионами кальция. Процесс электроактивации проводили при тех же условиях, что и на первом этапе.

На втором этапе обработки температура в КК возрастает быстрее в варианте с более низким содержанием хлористого кальция в анодной жидкости (0,5%). Очевидно, в этом случае количество энергоносителей уменьшается быстрее, чем во втором варианте (с использованием 1% хлористого кальция) (рис. 1, зависимости 3 и 2). Концентрация хлористого кальция определяет также величину и степень изменения напряжения в процессе электроактивации (рис. 3, зависимости 3 и 2).

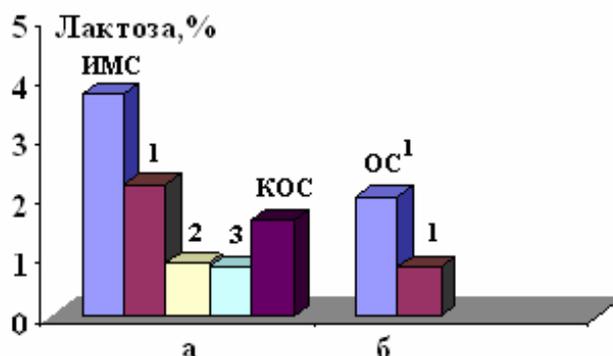


Рис. 4. Изменение содержания лактозы в обрабатываемой сыворотке в процессе электроактивации. Условия: см. рис. 1

Уже через 5–7 минут от начала второго этапа обработки наблюдается резкое повышение рН ОС¹ до значения, соответствующего оптимуму инвертирования лактозы (рН 11,0–11,5) (рис. 1,б). При продолжении процесса увеличение активной кислотности значительно замедляется, что обусловлено образованием окрашенных побочных продуктов реакции изомеризации, обладающих кислыми свойствами ОС¹ [1]. Степень их накопления настолько велика, что рН сыворотки из КК по окончании процесса ниже исходной ОС¹. Очевидно, что для осуществления конверсии лактозы в лактулозу повторную обработку ОС следует проводить при данных условиях не более 7 минут. За это время содержание лактозы в ОС¹ снижается на 55% (рис. 4,б). Убыль лактозы в результате двух этапов электроактивации – около 80%.

На втором этапе также наблюдается образование БМК. Количество белка, перешедшего в концентрат за первые 7 минут процесса, коррелирует с концентрацией хлористого кальция в анодном растворе и составляет 15–25% белка ОС¹.

Таким образом, поэтапная электрофизическая обработка молочной сыворотки позволяет не только увеличить выход лактулозо-лактозного продукта, но и получить два вида белково-минерального концентрата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Храмов А.Г., Рябцева С.А., Суюнчева Б.О. Исследование процесса изомеризации лактозы в лактулозу при электроактивации молочной сыворотки // Вестник СевКавГТУ, серия «Продовольствие». 2004. Вып. 7. С. 20–27.
2. Храмов А.Г., Синельников Б.М., Евдокимов И.А., Рябцева С.А., Серов А.В. Научно-технические основы технологии лактулозы // Вестник СевКавГТУ, серия «Продовольствие». 2004. Вып. 7. С. 12–18.
3. Храмов А.Г., Евдокимов И.А., Рябцева С.А., Серов А.В., Лодыгин Д.Н., Полищук Д.О., Харитонов Д.В., Самойлов В.А., Нестеренко П.Г., Журба Л.Н. Анализ информационного файла данных по способам производства концентратов лактулозы // Вестник СевКавГТУ, серия «Продовольствие». 2003. Вып. 6. С. 61–64.
4. Патент РФ₍₁₉₎RU₍₁₁₎2260286₍₁₃₎; С2(51)МПК; А23С21/00. Способ получения концентрата молочной сыворотки. 2004.11.07.
5. Спринчан Е.Г. Оптимизация технологических режимов получения белково-минерального концентрата из вторичного молочного сырья // Электронная обработка материалов. 2009. № 1. С. 73–80.

6. s 2009 0065 от 2009-04-23. Способ обработки молочной сыворотки.

7. Храмцов А.Г., Рябцева С.А., Журба Л.Н. Закономерности процесса изомеризации лактозы в лактулозу в подсырной сыворотке // Вестник СевКавГТУ, серия «Продовольствие». 2003. Вып. 6. С. 16–20.

8. Храмцов А.Г., Панова Н.М., Рябцева С.А., Евдокимов И.А., Лодыгин А.Д., Чабатов М.Г. Разработка технологии бифидоактивных кормовых добавок на основе молочного белково-углеводного сырья // Вестник СевКавГТУ, серия «Продовольствие». 2002. Вып. 5. С. 67–68.

Поступила 22.05.09

Summary

The analysis of possibilities of isomerisation of lactose into lactulose and mechanisms of its realization is carried out. The optimization of electrophysical method with the increase in quantity of the obtained inverted end-product is presented. The role of the amino acid content and nitrogen compounds in the course of transformation is shown. The quantitative composition of carbohydrates is shown. Electrophysical characteristics and the degree of lactose isomerisation at the two stages of processing are described.
