



Aspekty technologiczne i żywieniowe enzymatycznego wzbogacania mleka i jego przetworów w galaktooligosacharydy

Anna Demczuk, Włodzimierz Bednarski, Jadwiga Kowalewska-Piontas

Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Technological and nutritious aspects of enzymatic enrichment of milk and its derivatives in galactooligosaccharides

Summary

Enzymatic hydrolysis of lactose is accompanied by transgalactosylation reaction, thereby producing oligosaccharides. The prebiotic functions of oligosaccharides such as bifidogenic effect and health benefits connected with this effect were described. The mechanism of galactooligosaccharides formation and factors affecting it were also presented. Moreover, the examples of an enzymatic enrichment of milk and its derivatives in galactooligosaccharides were given.

Key words:

galactooligosaccharides, beta-galactosidase, prebiotics.

Adres do korespondencji

Anna Demczuk,
Katedra Biotechnologii
Żywności,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
ul. Heweliusza 1,
10-759 Olsztyn-Kortowo.

1. Wprowadzenie

Oligosacharydy (OS) są naturalnymi składnikami żywności. Zaliczane do nich galaktooligosacharydy (GOS) występują m.in. w owocach, warzywach oraz w miodzie. Współcześnie zwraca się zwiększoną uwagę na ich syntezę, ponieważ uważa się je za funkcjonalne składniki żywności, łączące właściwości prebiotyków, a zatem korzystne dla ludzkiego zdrowia z cechami fizykochemicznymi pożądanymi w procesach żywnościowych.

Preparaty handlowe OS są mieszaniną sacharydów zawierających 3-10 monomerów połączonych wiązaniami glikozydowymi. Galaktooligosacharydy zbudowane są z glukozy i galaktozy. Na skalę przemysłową są otrzymywane z laktozy po jej enzymatycznej transgalaktozylacji. Najczęściej jest to mieszanina cukrów różniących się składem monomerów, stopniem polimeryzacji oraz wiązaniami glikozydowymi. Dwucukry laktuloza i galaktobioza ze względu na podobne właściwości funkcjonalne również zalicza się do GOS (1).

Mleko ssaków zawiera 3-8% (w/v) laktozy. Cukier ten stanowi 70-80% stałych składników serwatki. Laktoza jest przyswajana przez człowieka dzięki obecności beta-galaktozydazy w jelicie cienkim. U noworodków poziom tego enzymu w organizmie jest wysoki, ale z czasem ulega on zmniejszeniu w wyniku ograniczeń w spożywaniu mleka oraz przebytych chorób układu pokarmowego. U części populacji stwierdza się brak aktywności beta-galaktozydazy z przyczyn genetycznych. Osoby ze zmniejszoną aktywnością beta-galaktozydazy lub brakiem tego enzymu źle trawią laktozę, co prowadzi do wzdęć, skurczów oraz biegunki. Objawy te znane są pod nazwą nietolerancji laktozy (2). Z tego względu pożądane są mleczne produkty bezlaktozowe, a obecność w nich OS niesie ze sobą dodatkowe korzyści zdrowotne, jak np. poprawę defekacji lub obniżenie poziomu cholesterolu we krwi.

2. Prozdrowotne właściwości oligosacharydów

W produkcji żywności węglowodany pełnią wiele technologicznych funkcji: zapobiegają zlepianiu się składników, spulchniają, emulgują, żelują, stabilizują, słodzą, są zamiennikami tłuszczu i nośnikami smaku. Ponadto są między innymi źródłami energii z funkcjami dietetycznymi i substratami do fermentacji w jelicie grubym.

Ostatnio wprowadza się do żywności węglowodany zaliczane do prebiotyków, m. in. inulinę, sacharozopochodne fruktooligosacharydy (FOS) oraz laktozopochodne galaktozydy.

Prebiotyki są to nie trawione przez człowieka dodatki do żywności, które mają korzystny wpływ na konsumenta poprzez selektywną stymulację wzrostu i/lub aktywności jednego lub ograniczonej liczby gatunków bakterii w okrężnicy, co prowadzi do poprawy zdrowia gospodarza (3).

Prebiotyki, aby mogły być stosowane w produkcji żywności, muszą posiadać znaną budowę chemiczną. Ponadto powinny sprzyjać wzrostowi liczby bakterii fermentacji mlekowej w przewodzie pokarmowym człowieka oraz hamować rozwój niepożądaną mikroflory jelitowej, obniżać pH treści pokarmowej, korzystnie oddziaływać na organizm gospodarza, nie powinny natomiast ulegać trawieniu przez enzymy przewodu pokarmowego (1,4) (tab. 1).

Tabela 1

Charakterystyka oligosacharydów pod względem ich cech prebiotycznych

Cechy pożądane w prebiotykach	Właściwości oligosacharydów
właściwości mikrobiologiczne	
aktywne w małej dawce	wysoce selektywnie i efektywnie metabolizowane przez korzystne dla człowieka bakterie, m.in. bifidobakterie i <i>Lactobacillus</i>
brak efektów ubocznych	bardzo korzystnie metabolizowane przez bakterie kwasu mlekowego, które nie produkują gazów i nie sprzyjają rozwojowi organizmów patogennych i gnilnych
dobra kontrola składu mikroflory	selektywnie metabolizowane tylko przez określone gatunki bifidobakterii i <i>Lactobacillus</i>
powolne przemieszczanie się przez okrężnicę	względnie duża masa cząsteczkowa, powolna fermentacja
efekty antypatogenne	
indukowanie w mikroorganizmach probiotycznych aktywności antypatogenne	nie zbadane
właściwości technologiczne	
różna lepkość	dostępne polimery o różnej masie cząsteczkowej
dobra stabilność podczas przechowywania i procesów technologicznych	posiadają 1-6 wiązania i piranozytowe pierścienie cukrowe
różna słodkość	różny skład monosacharydów

W Japonii oficjalnie dopuszczono jako składniki żywności 8 różnych OS, a mianowicie: GOS, fruktooligosacharydy (FOS), laktosacharozę, ksylozę, OS ziaren soi, rafinozę, laktulozę i izomaltooligosacharydy (IMO) (5).

OS są w różnym stopniu hydrolizowane i trawione przez bakterie okrężnicy, co prowadzi do wydzielania głównie kwasów: octowego, propionowego i masłowego oraz gazów (dwutlenku węgla i wodoru). Ponadto powstają kwasy mlekowy i mrówkowy, a u części populacji może być wydzielany metan (6).

Spożywanie OS niesie ze sobą różnorodne korzyści zdrowotne, m.in. sprzyjają one rozwojowi pożądanych bifidobakterii i redukcji populacji bakterii patogennych, obniżają poziom toksycznych metabolitów (amoniaku, amin, nitrozoamin, fenoli i krezoli, indoli i skatoli), zapobiegają biegunkom oraz zaparciom, obniżają ciśnienie krwi i poziom cholesterolu w surowicy krwi, działają ochronnie na wątrobę. Zalecane dzienne spożycie czystych form OS to: 3,0 g FOS, 2,0-2,5 g GOS, 2,0 g OS ziaren soi, 0,7 g ksylooligosacharydów (6-8).

GOS są rozpuszczalne w wodzie (9), stabilne w środowisku kwaśnym, są stosunkowo mało słodkie, nie są trawione w jelicie cienkim, są niskokaloryczne (wartość kaloryczna GOS 1,73 kcal/g) (5,10).

GOS są produkowane przede wszystkim w Japonii. W 1995 r. ich produkcja osiągnęła 15 000 t. Główne japońskie firmy zajmujące się produkcją GOS to: Yakult Honsha, Nissin Sugar Manufacturing Company, Snow Brand Milk Products (11) (tab. 2).

Tabela 2

Wielkość produkcji oligosacharydów w Japonii (11)

Oligosacharydy	Roczna produkcja (tony)
laktuloza	20 000
galaktooligosacharydy	15 000
fruktooligosacharydy	12 000
izomaltooligosacharydy	11 000
oligosacharydy ziaren soi	2 000
laktosacharoza	1 600
ksylooligosacharydy	300

Obecność GOS w żywności korzystnie wpływa na organizm człowieka m.in. dlatego że:

- polepsza defekację – zalecane jest spożywanie 5 g GOS dziennie przez kobiety i 10 g przez mężczyzn (5);
- redukuje absorpcję tłuszczu i cholesterolu (5,12);
- wywołuje podobny efekt fizjologiczny jak błonnik, tzn. obniża we krwi poziom cholesterolu, ciśnienie oraz stężenie glukozy (13);
- wspomaga proliferację i wzrost bifidobakterii i *Lactobacillus*, jednocześnie hamuje wzrost organizmów patogennych jak *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus* (9,14-18);
- wiąże patogeny, toksyny i częściowo wirusy (19);
- redukuje koncentrację fekalnego amoniaku (5);
- stanowi potencjalną ochronę przed rakiem okrężnicy (5,13);
- zwiększa wbudowywanie wapnia do kości i/lub hamuje resorpcję tkanki kostnej (20);
- stymuluje absorbcję magnezu (5);
- GOS nie są hydrolizowane przez mikroflorę jamy ustnej (*Streptococcus mutants*), a zatem ich obecność nie prowadzi do próchnicy (9,21).

Do FOS zaliczamy m.in. inulinę i oligofruktozę. FOS są wysoce higroskopijne, stabilne w zakresie pH 4,0-7,0, mniej słodkie niż sacharoza, a ich wartość energetyczna wynosi 6 kJ/g. Węglowodany te nazywane są „żywnością okrężniczą”, ponieważ w okrężnicy są pożywką dla endogennych bakterii, pośrednio stanowiąc dla gospodarza źródło energii i składników odżywczych.

Prowadzone są badania nad wpływem FOS na organizm człowieka. Podobnie jak i inne OS sprzyjają one wzrostowi bifidobakterii i *Lactobacillus*. Przyjmowanie 4 g FOS dziennie w formie tabletek do ssania powoduje wzrost populacji bifidobakterii, a to z kolei wiąże się z redukcją aktywności enzymów, jak glukuronidaza i hydroksylaza kwasu glikolikowego (*glucoronidase*, *hydroxylase glycollic acid*) (22), uczestni-

czących w syntezie fenotoksycznych metabolitów, w ten sposób FOS pośrednio zapobiegają rozwojowi chorób nowotworowych. W wyniku metabolizowania FOS przez bakterie powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe i kwas mlekowy, co obniża pH treści jelit. Powstaje w ten sposób korzystne środowisko dla rozwoju bifidogennej mikroflory, a jednocześnie ograniczony zostaje wzrost organizmów patogennych. Spożywanie 5-10 g FOS dziennie poprawia perystaltykę jelit i częstotliwość defekacji. Potwierdzeniem tych zależności są wyniki badań żywieniowych, w których grupie dzieci w wieku 6 lat cierpiących na przewlekłe biegunki podawano 8 g FOS dziennie przez 8 dni, po tym czasie zaobserwowano zdecydowaną poprawę wypróżniania. Spożywanie FOS redukuje poziom cholesterolu i triglicerydów we krwi oraz stymuluje absorpcję jonów wapnia, magnezu i żelaza (8,23-26).

Laktuloza jest używana jako dodatek w różnego typu produktach spożywczych (odżywki dla niemowląt, słodczyce, napoje bezalkoholowe, produkty mleczne) oraz w farmaceutykach, w celu poprawienia wątrobowej encefalopatii oraz przeciwdziałania zaparciom. Cukier ten jest metabolizowany przez *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Laktuloza hamuje szkodliwą produkcję amoniaku oraz sprzyja korzystnemu korygowaniu pH w stolcu (27).

Izomaltooligosacharydy (IMO) pełnią wiele ważnych biologicznych funkcji, przede wszystkim wpływają korzystnie na wzrost bifidobakterii oraz redukują kancerogeny wpływ sacharozy (28).

OS ziaren soi stanowią mieszaninę stachiozy, rafinozy i sacharozy. Japońscy naukowcy sugerują, że węglowodany te, ze względu na swoje prozdrowotne właściwości, powinny zastąpić na naszych stołach sacharozę. Spożywanie dziennie 10 g OS ziaren soi sprzyja rozwojowi bifidobakterii, wzrostowi długowieczności człowieka oraz obniża ryzyko raka okrężnicy. U pacjentów w wieku 69 lat, cierpiących na marskość wątroby i obstrukcje stwierdzono zmniejszenie się nasilenia symptomów w ciągu 5 dni przyjmowania OS ziaren soi w dawce 3,0 g na dzień. Ta sama dawka OS była przez tydzień podawana 6 zdrowym mężczyznom w wieku 28-48 lat, co spowodowało obniżenie ich ciśnienia rozkurczowego o 6,3 mm Hg (8).

Preparaty handlowe OS używane w produkcji żywności są najczęściej mieszaniną sacharydów o różnym stopniu polimeryzacji. Występują one w postaci sypkiej lub syropu.

GOS są stosowane głównie w produkcji napojów i odżywek dla dzieci oraz jako funkcjonalne składniki słodczy, substytuty sacharozy w diabetycznych wyrobach cukierniczych, komponenty spulchniające, słodziki, dodatki do napojów bezalkoholowych, jogurtów, gumy do żucia, dodatki do kosmetyków i środki farmaceutyczne (1,29).

Szerokie zastosowanie w przemyśle mleczarskim znalazła inulina. Jako środek zastępujący żelatynę, kazeiniany i pochodne skrobi jest ona używana w produkcji mlecznych napojów fermentowanych, serków topionych, napojów i koktajli mlecznych oraz serwatkowych, śmietanki zwykłej i do ubijania, produktów masłopodobnych o obniżonej zawartości tłuszczu i lodów. Jako zamiennik tłuszczu inulina stosowana jest w przemyśle mięsny w produkcji pasztetów i kiełbas, a w piekarnictwie w produkcji ciastek, krakersów i płatków śniadaniowych (1).

3. Kierunki i możliwości otrzymywania galaktooligosacharydów

Istnieją chemiczne i biochemiczne metody pozyskiwania GOS. GOS można otrzymać stosując kwas hydrochlorowy do hydrolizy wiązań glikozydowych w laktozie oraz do ograniczonej transgalaktozylacji. Wadą tej metody jest niska wydajność GOS oraz drastyczne warunki reakcji (30). Istnieją również biochemiczne możliwości syntezy GOS wykorzystujące różne enzymy. W tym zakresie na uwagę zasługują:

1. GOS syntetyzowane przy zastosowaniu glikozylotransferaz szlaku Leloir'a wymagających nukleotydów jako donorów;
2. GOS syntetyzowane przez glikozylotransferazy nie należące do szlaku Leloir'a, a wymagające cukro-1-fosforanów jako donorów;
3. GOS syntetyzowane z użyciem glikozydaz (30,31).

Enzymy stosowane w dwóch pierwszych metodach są drogie i charakteryzują się zbyt niską stabilnością, aby można je było stosować na dużą skalę. Trzeci typ reakcji jest katalizowany m.in. przez beta-galaktozydazę.

Beta-galaktozydaza (EC 3.2.1.23) prowadzi reakcję hydrolizy laktozy, której produktami są glukoza i galaktoza. Obok tej reakcji katalizowane są reakcje transferu prowadzące do powstania galaktooligosacharydów, przede wszystkim di-, tri- i tetrasacharydów (6,32-35). Reakcje te wykorzystywane są do produkcji OS na skalę przemysłową (11).

Reszta cukrowa, tworząca glikonową część substratu, może zostać przeniesiona na różne rodzaje akceptorów. Jeżeli akceptorem jest woda zachodzi reakcja hydrolizy. W procesie gdy substratem jest laktoza, a akceptorem inny cukier lub alkohol mamy do czynienia z reakcją transgalaktozylacji. Jeżeli akceptorem jest inny cukier powstają oligosacharydy i tak, gdy akceptorem jest monosacharyd otrzymamy disacharyd, jeżeli akceptorem jest disacharyd powstanie trisacharyd, itd. (8).

Warunki reakcji transgalaktozylacji są łagodne (temperatura w przedziale 35-60°C, pH 4,5-7,0), nie wymaga ona kofaktorów lub drogich substratów. Niezbędne preparaty beta-galaktozydazy można uzyskać przy względnie niskich nakładach (6,36). Wydajność enzymatycznej syntezy GOS jest różna. Zależy ona m.in. od rodzaju i stężenia substratu, koncentracji enzymu, źródła enzymu i warunków reakcji. Na przykład preparat enzymatyczny beta-galaktozydazy z *A. oryzae* syntetyzuje GOS z wydajnością 32%, a zastosowanie beta-galaktozydazy z *B. circulans* pozwala uzyskać wydajność syntezy GOS wynoszącą 24% (29) (tab. 3).

Tabela 3

Wydajność syntezy galaktooligosacharydów katalizowanej przez beta-galaktozydazy pochodzące z różnych źródeł

Źródło beta-galaktozydazy	Wydajność syntezy galaktooligosacharydów (%)	Literatura
1	2	3
<i>Aspergillus oryzae</i>	32	(29)
<i>Bacillus circulans</i>	24	(29)

1	2	3
<i>Thermus aquaticus</i>	34,8	(29)
<i>Bullera singularis</i>	54	(29)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	26	(34)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	32	(34)
<i>Sterigmatomyces elviae</i> CBS8119	39	(49)
<i>Escherichia coli</i>	38	(46)

Średnio wydajność syntezy GOS zamyka się w przedziale 25-50% całkowitej zawartości cukrów (10). W środowisku reakcji hydrolizy laktozy GOS nieustannie są syntetyzowane i rozkładane, zatem ich zawartość w hydrolizacie jest zmienna. Podane wartości odpowiadają maksymalnej wydajności syntezy GOS.

Hydrolizaty laktozy zawierają zazwyczaj mieszaninę sacharydów o różnej masie cząsteczkowej. Obok GOS, które występują w formie izomerów, znajdują się w niej polisacharydy, nieprzereagowana laktoza oraz monosacharydy.

Oddzielenie laktozy od dwucukrowych frakcji GOS jest trudne i prowadzi do dużych strat produktu. Splechna i wsp. (10) zaproponowali nową metodę oczyszczania GOS opartą na selektywnej enzymatycznej oksydacji laktozy do kwasu laktobionowego katalizowanej przez dehydrogenazę celobiozy. Otrzymany kwas łatwo jest oddzielić od cukrów metodą chromatografii anionowymiennej. Po usunięciu monosacharydów uzyskuje się mieszaninę GOS o wysokiej czystości, rzędu 97% (10).

Mikrofiltracja i ultrafiltracja pozwalają oddzielić GOS od enzymów o większej masie molekularnej oraz od polisacharydów. Pozostała mieszanina zawierająca mniejsze molekuly, jak np. monosacharydy, może być oczyszczona metodą nanofiltracji (NF), która jest konkurencyjna wobec droższych technik chromatograficznych (37).

Początkowo prowadzono rozdział i identyfikację GOS metodami chromatografii bibułowej, gazowej lub cienkowarstwowej (38). Rzadko do wstępnego oczyszczania stosowano węgiel aktywny (39). Jednak metody te są pracochłonne i czasochłonne. Szybkość analiz zwiększyła się kiedy do separacji i określania zawartości GOS zastosowano techniki wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC).

W charakterystyce struktury GOS największe trudności nastęca separacja ich izomerów. Do ich rozdziału stosowana jest metoda pirydylaminacji, a następnie struktura GOS oznaczana jest z wykorzystaniem technik C-NMR-spektroskopii (39).

W celu wyizolowania GOS z ich mieszaniny Kimura i wsp. (39) poddali je rozdziałom HPLC. Poszczególne GOS konwertowano w pochodne pirydylaminowe, co pozwoliło rozdzielić izomery i oznaczyć ich masę cząsteczkową metodą NMR. Ilość reszt cukrowych w każdej pochodnej była określana na podstawie liczby anemerycznych węglowych sygnałów w ich NMR spektrum i potwierdzana poprzez pomiar masy cząsteczkowej.

4. Czynniki decydujące o enzymatycznej syntezie galaktooligosacharydów

Na powstawanie i skład GOS w reakcji transgalaktozylacji ma wpływ szereg czynników: rodzaj substratu, jego koncentracja, dawka enzymu, pH, temperatura reakcji, czas reakcji, źródło enzymu, obecność soli mineralnych, a ponadto techniki produkcyjne, głównie forma enzymu wolna lub immobilizowana (13,33,35).

4.1. Źródło enzymu

Beta-galaktozydaza jest enzymem syntetyzowanym zarówno przez rośliny wyższe (brzoskwinia, morela, migdały (40), fasola mung, ziarna soi (41), jęczmień (42)), ssaki jak i mikroorganizmy: bakterie, drożdże oraz grzyby strzępkowe (35). Do przemysłowej produkcji GOS wykorzystywane są głównie enzymy pochodzenia mikrobiologicznego z: *S. torulopsis*, *S. fragilis*, *S. lactis*, *E. coli*, *A. niger* (43) i *A. oryzae* (16).

Beta-galaktozydaza z różnych źródeł syntetyzuje różne typy i ilości GOS (14,34). Preparaty beta-galaktozydazy syntetyzowane przez bakterie *Sulfolobus solfataricus* i *Pyrococcus furiosus* (34) oraz *Bullera singularis* (29) syntetyzują głównie di- i trisacharydy. Enzym pochodzący z *B. circulans* syntetyzuje GOS o wyższym stopniu polimeryzacji (tetra- i pentaoligosacharydy) (14). Jakkolwiek wg Fontesa i wsp. (44) beta-galaktozydaza z *B. circulans* syntetyzuje też di- i trisacharydy. Beta-galaktozydaza grzybów strzępkowych z rodzaju *A. oryzae* podobnie, jak drożdży *Kluyveromyces* spp. syntetyzuje głównie trisacharydy i niewielkie ilości tetrasacharydów (14). Wydajność syntezy GOS katalizowanej przez beta-galaktozydazę z drożdży jest wyższa, niż wydajność syntezy GOS katalizowanej przez enzym pochodzenia pleśniowego (13).

4.2. Wpływ koncentracji i rodzaju substratu

Charakter i liczba GOS powstających w reakcjach transgalaktozylacji katalizowanych przez enzym beta-galaktozydazę zależy od początkowego stężenia i rodzaju substratu. Wydajność syntezy GOS z laktozy rośnie wraz ze wzrostem początkowego stężenia tego cukru (13,16,29,34,44,45). Użycie wysokich stężeń początkowych laktozy umożliwia uzyskanie większych ilości GOS. Prawdopodobnie grupy beta-galaktozylowe mają większe powinowactwo do laktozy i/lub GOS niż do wody wraz ze wzrostem koncentracji laktozy (16). W syntezie GOS większe znaczenie ma początkowe stężenie laktozy niż, np. zmiany temperatury (14).

Zarate i Lopez-Leiva (35) stwierdzili, że użycie laktozy w roztworze buforu (np. fosforanowego, pH 6,2) sprzyja większej wydajności syntezy GOS niż zastosowanie mleka lub produktów mlecznych. Aktywność enzymu beta-galaktozydazy z *E. coli* i *K. lactis* jest niższa w mleku niż w roztworze laktozy w buforze o pH 6,6 (25 mM bufor o składzie kwas cytrynowy/ fosforan potasu). Jednak beta-galaktozydaza

z *B. circulans* zachowuje zbliżoną aktywność zarówno w mleku odtłuszczonym, jak i w roztworze laktozy w tym buforze (46). Co więcej Mozaffar i wsp. (46) stwierdzili, że jeden z dwóch izomerów beta-galaktozydazy syntetyzowanej przez *B. circulans* syntetyzuje znacznie mniej GOS podczas hydrolizy laktozy w buforze.

4.3. Wpływ czasu reakcji

Skład GOS występujących w hydrolizacie laktozy podczas reakcji transgalaktozylacji zmienia się w czasie. W dążeniu do ustalenia warunków transgalaktozylacji ważne jest zidentyfikowanie, który produkt pojawia się lub znika w określonym czasie reakcji enzymatycznej, co pozwoli kontrolować skład mieszaniny węglowodanów (34). Wydajna synteza GOS wymaga nie tylko optymalizacji warunków ich syntezy, ale również zminimalizowania wtórnej degradacji tych związków (47).

W miarę postępowania reakcji hydrolizy laktozy i towarzyszącej jej transgalaktozylacji katalizowanej przez beta-galaktozydazę z *A. oryzae* zawartość laktozy w mleku zmniejsza się, a suma glukozy (Glu) i galaktozy (Gal) wzrasta. Jednak zawartość Gal jest znacząco niższa niż Glu, bo Gal użyta zostaje do formowania GOS. Wydajność 5-sacharydów wzrasta w czasie, podczas gdy przyrost 4-, i 3-sacharydów stwierdza się w fazie początkowej (30 min), a potem w miarę reakcji transgalaktozylacji jest mniejszy. Świadczy to o tym, że 3-sacharydy przechodzą w 4-, i 5-sacharydy w miarę postępowania reakcji transgalaktozylacji (45).

Podczas hydrolizy laktozy prowadzonej przy użyciu beta-galaktozydazy z *B. circulans* (46) w początkowym jej stadium formowane są trisacharydy, które w miarę upływu czasu reakcji znikają całkowicie, a w zamian powstają dodatkowe disacharydy. Sterując czasem reakcji można syntetyzować określone węglowodany (34,45). Wiadomo, że niektóre GOS są konwertowane w monosacharydy po 70 h reakcji (16).

4.4. Wpływ temperatury

Wiele z preparatów beta-galaktozydazy o właściwościach transgalaktozylacyjnych traci aktywność w temperaturach powyżej 50°C. Na przykład beta-galaktozydaza z *A. oryzae* jest stabilnym i wydajnym katalizatorem reakcji transgalaktozylacji do 50°C. Preparaty beta-galaktozydazy z *K. fragilis* i *K. lactis* po przekroczeniu temperatury reakcji wynoszącej 40°C gwałtownie tracą swoją aktywność transgalaktozylacyjną i hydrolityczną (21). Z kolei laktoza posiada ograniczoną rozpuszczalność w wodzie w temperaturze pokojowej i dopiero podwyższenie temperatury do 40°C powoduje poprawę rozpuszczalności.

Prowadzenie reakcji transgalaktozylacji w wysokich temperaturach (65-80°C) pozwala na stosowanie wyższych stężeń laktozy, a co za tym idzie pozyskiwanie większych ilości GOS, ponadto zmniejszone zostaje prawdopodobieństwo zakażeń mi-

krobiologicznych, a roztwór laktozy posiada niższą lepkość (18,36). Dlatego ważnym kierunkiem otrzymywania GOS jest zastosowanie termostabilnych enzymów beta-galaktozydazy.

Zastosowanie wyższych temperatur niesie ze sobą również zagrożenia jak: prawdopodobieństwo niestabilności substratów i produktów oraz możliwość reakcji ubocznych, np. reakcji Maillarda między cukrami i białkami enzymatycznymi, prowadzących do inaktywacji enzymów oraz powstawania brązowej barwy. W mieszaninie enzym-laktoza aminokwasy białek enzymów reagują z redukującym końcem laktozy, co prowadzi do zmiany struktury pierwszorzędowej enzymu, a tym samym jego inaktywacji. Zmniejszenie negatywnego wpływu reakcji Maillarda osiąga się poprzez zmianę warunków reakcji lub modyfikację właściwości enzymu. Podczas procesu można zmieniać typ i stężenie redukujących cukrów, pH, temperaturę, zawartość tlenu i aktywność wodną. Obniżenie aktywności wody $a_w < 0,6$ utrudnia przebieg reakcji Maillarda. Niskie pH (poniżej 5,0) tłumi te reakcje, jednak jednocześnie obniżona zostaje aktywność beta-galaktozydazy. Efekt reakcji Maillarda ogranicza również zastosowanie immobilizowanych preparatów beta-galaktozydazy, np. immobilizacja na Eupergicie (48).

Petzelbauer i wsp. (34) prowadzili reakcję transgalaktozylacji w 70°C wykorzystując enzymy z *Sulfolobus solfataricus* (SsbGly) i *Pyrococcus furiosus* (CelB). Wydajność syntezy GOS wynosiła 26% dla SsbGly i 32% dla CelB przy początkowej koncentracji laktozy 270 g/l. SsbGly syntetyzowała większe ilości trisacharydów, jakkolwiek w procesie z CelB uzyskano większą wydajnością syntezy GOS. W reakcjach transgalaktozylacji katalizowanych przez oba enzymy powstała głównie mieszanina di- i trisacharydów. Właściwości transgalaktozylacyjne hipertermostabilnej beta-galaktozydazy z *Pyrococcus furiosus* badał również Bruins (36). Stwierdził on, że w reakcji transgalaktozylacji laktozy prowadzonej w 80°C powstają tri- i tetrasacharydy. Beta-galaktozydaza z *Sterigmatomyces elviae* CBS8119 zachowuje aktywność w 80°C. W temperaturze 60°C przy stężeniu laktozy 200 mg/ml katalizuje reakcję transgalaktozylacji z wydajnością ok. 40% (49). *Caldocellum saccharolyticum* syntezuje beta-galaktozydazę charakteryzującą się wysoką odpornością na termiczną inaktywację. W temperaturze 80°C i przy stężeniu laktozy 70% (ww.) wydajność syntezy GOS przez tę beta-galaktozydazę wynosi 42% (21).

4.5. Obecność soli mineralnych i monosacharydów

Określone jony mogą działać inhibująco lub aktywująco na beta-galaktozydazę (13). Aktywność beta-galaktozydazy z *K. fragilis* jest hamowana przez jony Na^+ i Ca^{2+} , natomiast stymulująco wpływa na nią obecność jonów K^+ i Mg^{2+} . Działanie beta-galaktozydazy z *K. lactis* jest inhibowane przez jony Na^+ i Ca^{2+} , natomiast beta-galaktozydaza z *K. fragilis* aktywowana jest przez Ni^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Co^{2+} (50). Aktywność enzymu z *Thermus* spp. hamują głównie jony Cu^{2+} (50).

Sprawdzano również czy obecność glukozy i galaktozy inhibuje syntezę GOS. Stwierdzono, że węglowodany te działają hamująco na powstawanie GOS. Synteza GOS przez beta-galaktozydazę *B. circulans* lub *K. fragilis* hamowana jest przez obecność glukozy. Galaktoza osłabia syntezę GOS przez enzym z *A. oryzae* i *K. lactis*. Aktywność beta-galaktozydazy z *Kluyveromyces* spp. jest w mniejszym stopniu hamowana przez monosacharydy niż aktywność enzymu pochodzącego z *B. circulans* i *A. oryzae* (14).

Obecność glukozy w środowisku nie wpływa na hydrolizę laktozy przez beta-galaktozydazę z *Aspergillus foetidus*. Obecność galaktozy w środowisku inhibuje beta-galaktozydazę z *K. lactis* (44).

4.6. Forma enzymu

Początkowo GOS otrzymywano metodami okresowymi. Jednak wzrost ich funkcjonalnego znaczenia w żywieniu spowodował konieczność poprawy wydajności reakcji biokonwersji laktozy i przemysłowej produkcji GOS. Ze względu na warunki ekonomiczne wysoce pożądanym stał się rozwój procesów ciągłych w produkcji GOS (29). Upowszechnianiu takich procesów sprzyja immobilizacja enzymów. Czynniki ją warunkujące to: bezpieczeństwo stosowanych nośników i odczynników, fizyczne i chemiczne właściwości nośników, podatność na zanieczyszczenia mikrobiologiczne.

W procesach ciągłych największym zagrożeniem są zanieczyszczenia mikrobiologiczne, dlatego roztwory substratów wymagają sterylizacji lub pasteryzacji. W syntezie GOS korzystne jest stosowanie wysokiego stężenia substratów, co prowadzi do obniżenia aktywności wody, a tym samym zmniejsza się ryzyko zakażeń mikrobiologicznych (29).

W reakcjach z udziałem immobilizowanego preparatu beta-galaktozydazy, m.in. z *K. lactis* lub *B. singularis*, znana jest zależność, że wydajność syntezy GOS wzrasta ze wzrostem początkowego stężenia laktozy (15,29).

Foda i wsp. (15) prowadzili ciągłą hydrolizę laktozy utrzymując beta-galaktozydazę wewnątrz UF-membranowego reaktora. Działanie takiego reaktora opiera się na różnicy wielkości między cząsteczkami beta-galaktozydazy a składnikami roztworu (glukozy, galaktozy, oligosacharydów i niezhydrolizowanej laktozy). Beta-galaktozydaza jest utrzymywana przez membranę w module ultrafiltracyjnym, podczas gdy cukry przez nią przechodzą i pozostają w roztworze. W ten sposób zimmobilizowane zostały preparaty beta-galaktozydazy *Kluyveromyces* spp.. Uzyskane wydajności syntezy GOS przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

Wydajność enzymatycznej syntezy galaktooligosacharydów w ciągłych procesach transgalaktozylacji laktozy

Źródło beta-galaktozydazy	Sposób immobilizacji beta-galaktozydazy	Warunki reakcji	Wydajność syntezy galaktooligosacharydów (%)	Literatura
<i>Bullera singularis</i>	adsorpcja na chitozanie	10% laktozy, 45°C, pH 4,8	55	(29)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	reaktor membranowy, skala laboratoryjna	23% laktozy, 45°C, pH 7,0	20	(15)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	reaktor membranowy, skala mikrotechniczna	20% laktozy, 45°C, pH 7,0	31	(15)

Lopez-Leiva i wsp. (17) do hydrolizy UF-permeatu zostosowali beta-galaktozydazę z *A. oryzae* immobilizowaną w membranie mikroporowatej. Enzym został związany kowalencyjnie z udziałem glutaraldehydu z dwutlenkiem krzemu w porach membrany. Stwierdzono, że o wydajności powstawania GOS decyduje tzw. czas oporu. Im krótszy ten czas (5-15s) tym korzystniejsza wydajność reakcji transgalaktozylacji. Jeżeli się on wydłuża GOS są hydrolizowane do monocukrów. W innej propozycji beta-galaktozydazę z *Bullera singularis* związane z chitozaniem (29). Maksymalna wydajność syntezy GOS wynosiła 54%, przy stopniu hydrolizy laktozy 73%. Powstałe GOS składały się głównie z di- (beta-D-Galp-(1-3)-beta-D-Glc)- i trioligosacharydów (beta-D-Galp-(1-4)-beta-D-Galp-(1-4)-Glc). Nie zaobserwowano pogorszenia aktywności transgalaktozylacyjnej immobilizowanego enzymu w ciągu 15 dni.

Wpływ wymienionych czynników na syntezę GOS trudno jest rozpatrywać osobno, ponieważ dopiero uwzględnienie ich wspólnego oddziaływania pozwala ustalić optymalne warunki reakcji transgalaktozylacji.

5. Warunki enzymatycznej transgalaktozylacji laktozy w mleku lub permeacie po jego ultrafiltracji

Ze względu na występującą u wielu ludzi nietolerancję laktozy oraz właściwości zdrowotne GOS obserwuje się zainteresowanie produkcją mleka bezlaktozowego o wysokiej zawartości GOS.

Podstawowym problemem w pozyskiwaniu takiego produktu jest stosunkowo niska wydajność syntezy GOS. Główną przyczyną takiego stanu jest, jak się wydaje, obecność białek w mleku lub serwatce wpływających inhibująco na aktywność beta-galaktozydazy.

Według Chena i wsp. (45) istnieją następujące metody produkcji mleka o niskiej zawartości laktozy i wysokiej GOS:

– stosowanie enzymu beta-galaktozydazy, która prowadzi biokonwersję laktozy w zagęszczonym mleku bezpośrednio w GOS;

– zastosowanie ultrafiltracji mleka mającej na celu oddzielenie laktozy od białek, koncentrację filtratu poprzez odparowanie, enzymatyczną transgalaktozylację laktozy w filtracie w GOS i dodanie go do retentatu mleka.

Potwierdzeniem tych możliwości jest proces hydrolizy laktozy w mleku i w filtracie po procesie ultrafiltracji mleka opisany przez Chena i wsp. (45), w którym zastosowano beta-galaktozydazę z *A. oryzae*. Stwierdzono, że w optymalnych warunkach (stosunek enzym/substrat 5,1%, 47°C, 1,4 h) wydajność GOS w skoncentrowanym mleku (16,7% laktozy) wynosi 22,8%. Podczas gdy po usunięciu białek mleka metodą ultrafiltracji koncentracja laktozy wzrasta do 25,3% i przy stosunku E/S 6,7% w 50°C 3,5 h 25,3% laktozy maksymalna ilość GOS w filtracie wynosi 31,1%. Nawet jeżeli w filtracie koncentracja laktozy wynosi 16,7%, maksymalna zawartość GOS osiąga wartość 27,9%, a zatem dalej jest to więcej niż w mleku. Jednak po dodaniu filtratu wzbogaconego w GOS do retentatu ich całkowita zawartość w rekonstruowanym mleku wynosi 22%, a zatem jest zbliżona do zawartości GOS w mleku nie poddanym ultrafiltracji. Można stwierdzić, że zastosowanie ultrafiltracji może poprawić wydajność GOS, zależy ona jednak od zawartości laktozy w filtracie. Widać stąd, że beta-galaktozydaza wykazuje lepsze właściwości transgalaktozylacyjne w filtracie niż w mleku.

6. Podsumowanie

W opracowaniu przedstawiono wybrane aspekty enzymatycznego wzbogacania mleka oraz jego przetworów w GOS. Dokonano tego w oparciu na własnych doświadczeniach (51-53) oraz na badaniach prowadzonych przez innych autorów.

Zwrócono uwagę na zdolności transgalaktozylacyjne preparatów beta-galaktozydazy oraz na warunki technologiczne decydujące o wydajności syntezy GOS. Przedstawiona problematyka ma duże znaczenie aplikacyjne, przede wszystkim w odniesieniu do rozszerzania asortymentu fermentowanych napojów mlecznych wzbogaconych w GOS. Na uwagę zasługuje możliwość zastosowania w tym celu filtratu po ultrafiltracji mleka lub serwatki. Problematyka ta jest przedmiotem szczegółowych badań prowadzonych w Katedrze Biotechnologii Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Literatura

1. Jakubczyk E., Kosikowska M., (2000), *Przegl. Mlecz.*, 12, 397-400.
2. Kowalewska-Piontas J., Bednarski W., (1999), *Żywność*, 4/21, 54-61.
3. Gibson G. R., Roberfroid M. B., (1995), *J. Nutr.*, 125, 1401-1412.
4. Fooks L. J., Fuller R., Gibson G. R., (1999), *Int. Dairy J.*, 9, 53-61.
5. Sako T., Matsumoto K., Tanaka R., (1999), *Int. Dairy J.*, 9, 69-80.
6. Mitsuoka T., (1996), *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 5, 1, 2-9.
7. Jacorzyński B., (1996), *Żywność Człowieka i Metabolizm*, 12, 3, 284-288.
8. Tomomatsu H., (1994), *Food Technol.*, 10, 61-65.

9. Karasova P., Spiwok V., Mala S., Kralova B., Russell N. J., (2002), *Czech J. Food Sci.*, 20, 2, 43-47.
10. Splechtna B., Petzelbauer I., Baminger U., Haltrich D., Kulbe K. D., Nidetzky B., (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 29, 434-440.
11. Crittenden, R. G., Playne M. J., (1996), *Trends in Food Sci. Technol.*, 7, 353-361.
12. Ziemer C. J., Gibson G. R., (1998), *Int. Dairy J.*, 8, 473-479.
13. Rustom I. Y. S., Foda M. I., Lopez-Leiva M. H., (1998), *Food Chem.*, 62, 2, 141-147.
14. Boon M. A., Janssen A. E. M., van't Riet K., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 271-281.
15. Foda M., Lopez-Leiva M., (2000), *Process Biochem.*, 35, 581-587.
16. Iwasaki K. I., Nakajima M., Nakao S. I., (1996), *Process Biochem.*, 31, 1, 69-76.
17. Lopez Leiva M. H., Guzman M., (1995), *Process Biochem.*, 30, 8, 757-762.
18. Perrin V., Fenet B., Praly J. P., Lecroix F., Ta C. D., (2000), *Carbohydr. Res.*, 325, 202-210.
19. Scigelova M., Crout D. H. G., (2000), *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, 8, 175-181.
20. Karczmarewicz E., Skorupa E., Lorenc R. S., (2002), *Pediatrics Współczesna, Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 4, 1, 63-69.
21. Stevenson D. E., Stanley R. A., Furneaux R. H., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 544-549.
22. Losada M. A., Ollerros T., (2002), *Nutr. Res.*, 22, 1-2, 71-84.
23. Chen H. L., Lu Y. H. R. N., Lin J. J., Ly K. O., (2000), *Nutr. Res.*, 20, 12, 1725-1733.
24. Baba S., Ohta A., Ohtsuki M., Takizawa T., Adahi T., Hara H., (1996), *Nutr. Res.*, 16, 4, 657-666.
25. Roberfroid M. B., (2000), *Nutrition*, 16, 7/8, 677-679.
26. Yun J. W., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 107-117.
27. Saarela M., Hallamaa K., Mattila-Sandholm T., Mättö J., (2003), *Int. Dairy J.*, 13, 291-302.
28. Tanriseven A., Doğan Ş., (2002), *Process Biochem.*, 37, 1111-1115.
29. Shin H. J., Park J. M., Yang J. W., (1998), *Process Biochem.*, 33, 8, 787-792.
30. Ekhard P. F., Timmermans E., (1996), *Bulletin of the IDF*, 313, 59-64.
31. Endo T., Koizumi S., (2000), *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 536-541.
32. Mahoney R. R., (1998), *Food Chem.*, 63, 2, 147-154.
33. Prenosil J. E., Stuker E., Bourne J. R., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 1019-1025.
34. Petzelbauer I., Zeleny R., Reiter A., Kulbe K. D., Nidetzky B., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 2, 140-149.
35. Zarate S., Lopez-Leiva M. H., (1990), *J. Food Prot.*, 53, 3, 262-268.
36. Bruins M. E., Strubel M., van Lieshout J. F. T., Janssen A. E. M., Boom R. M., (2003), *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 3-11.
37. Goulas A. K., Petros G., Kapasakalidis P. G., Sinclair H. R., Rastall R. A., Grandison A. S., (2002), *J. Membr. Sci.*, 209, 321-335.
38. Jeon I. J., Mantha V. R., (1985), *J. Dairy Sci.*, 68, 581-588.
39. Kimura K., Matsumoto K., Ishihara C., Harada K., Miyagi A., (1995), *Carbohydr. Res.*, 270, 33-42.
40. Gekas V., Lopez-Leiva M., (1985), *Process Biochem.*, 20, 1, 2-11.
41. Kaushal G. P., Pastuszak I., Hatanaka K., Elbein A. D., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 16271-16279.
42. Leah R., Kigel J., Svendsen I., Mundy J., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 15789-15797.
43. Burvall G. A. A., Dahlqvist A., Hallgren P., Lundblad A., (1980), *Food Chem.*, 5, 147-153.
44. Fontes, E. A. F., Passos F. M. L., Passos F. J. V., (2001), *Process Biochem.*, 37, 267-274.
45. Chen C. S., Hsu C. K., Chiang B. H., (2002), *Process Biochem.*, 38, 801-808.
46. Mozaffar Z., Nakanishi K., Matsuno R., (1985), *J. Food Sci.*, 50, 1602-1606.
47. Nilsson K. G. I., (1988), *Trends Biotechnol.*, 6, 256-264.
48. Bruins M. E., Thewessen A. J. H., Janssen A. E. M., Boom R. M., (2003), *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, 31-34.
49. Onishi N., Tanaka T., (1995), *Appl. Environmental Microbiol.*, 61, 11, 4026-4030.
50. Ladero M., Santos A., Garcia J. L., Carrascosa A. V., Pessela B. C. C., Garcia-Ochoa F., (2002), *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 392-405.
51. Kowalewska-Piontas J., Bednarski W., Bielecka M., (2002), *Polish J. Food Nutr. Sci., Olsztyn*, 11, 2, 7-16.
52. Kowalewska-Piontas J., Bednarski W., (2001), *Polish J. Food Nutr. Sci., Olsztyn*, 10, 3, 43-46.
53. Bednarski W., Kowalewska-Piontas J., (2000), *Biotechnologia*, 2, 49, 131-141.