



# Wpływ warunków reakcji na wydajność enzymatycznej syntezy galaktooligosacharydów przez $\beta$ -galaktozydazę z *Penicillium canescens*

Włodzimierz Bednarski, Anna Kulikowska

Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski,  
Olsztyn

## Influence of reaction conditions on yield of enzymatic synthesis galactooligosacharides by *Penicillium canescens* $\beta$ -galactosidase

### Summary

The aim of the work was to examine the ability of *Penicillium canescens*  $\beta$ -galactosidase to synthesize galactooligosacharides in one or two-phase medium (organic solvents: water). The yield of this process depends mainly on: lactose concentration in water phase, time of reaction, kind of organic solvents and their participation in two-phase medium.

The application of ultrafiltration for separation of saccharides from the reaction medium stabilized the yield of galactooligosacharides synthesis.

### Key words:

$\beta$ -galactosidase, lactose, galactooligosacharides, organic solvents, two-phase medium.

### Adres do korespondencji

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

## 1. Wstęp

Galaktooligosacharydy (GOS) są zaliczane do funkcjonalnych składników żywności o właściwościach stymulujących rozwój Bifidobakterii i probiotycznych bakterii mlekowych w jelitach konsumentów sprzyjając ich zdrowiu (1,2).

W składzie ich cząsteczek występuje od 3 do 10 monomerów galaktozy i glukozy połączonych wiązaniami glikozydowymi (3). Ze względu na podobne właściwości funkcjonalne zalicza się do nich także laktulozę i galaktobiozę (4).

Galaktooligosacharydy najczęściej otrzymuje się z laktozy w reakcji transgalaktozyzacji katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę. Są one także syntetyzowane przy zastosowaniu glikozylotransferaz (3). Wydajność syntezy GOS katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę zależy od źródła i właściwości enzymu, a także od stężenia substratu i składników towarzyszących, np. soli mineralnych, białek itp. oraz od kwasowości i temperatury.

W ocenie wpływu właściwości enzymu zwraca się uwagę na regioselektywność w reakcji transgalaktozyzacji. Na przykład  $\beta$ -galaktozydaza z *E. coli* katalizuje syntezę wiązania  $\beta$ -1,6 a enzym z *Diplococcus pneumoniae* jest selektywny w tworzeniu wiązań  $\beta$ -1,4 (7). Ważnym czynnikiem, decydującym o wydajności syntezy GOS, jest początkowe stężenie laktozy w środowisku reakcji. Jej możliwie wysoka koncentracja (uwarunkowana rozpuszczalnością) pozwala uzyskać korzystną wydajność syntezy GOS (7). Prowadzenie reakcji transgalaktozyzacji w 30% roztworze laktozy pozwala uzyskać mieszaninę di, tri, tetra, penta i heksasacharydów z tym, że te wyższe GOS występują w niewielkich ilościach (8).

Z badań własnych wynika (dane nie publikowane), że skład oraz procentowy udział GOS w produktach reakcji laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą nie jest stabilny w czasie, ponieważ syntetyzowane GOS w zależności od stanu równowagi reakcji enzymatycznej mogą być degradowane do monosacharydów. W dążeniach do uzyskania możliwie korzystnej wydajności syntezy GOS zwraca się także uwagę na obniżanie aktywności wody w środowisku reakcji enzymatycznej, np. przez stosowanie rozpuszczalników organicznych.

Uwzględniając dość liczną grupę czynników decydujących o wydajności enzymatycznej syntezy GOS, w dużym stopniu zależnych od właściwości biokatalizatora postanowiono je ustalić dla preparatu  $\beta$ -galaktozydazy z *Penicillium canescens* i porównać z właściwościami handlowo dostępnego preparatu z *Aspergillus oryzae*.

W ocenie wpływu warunków reakcji na wydajność syntezy GOS przez preparat  $\beta$ -galaktozydazy z *Penicillium canescens* szczególną uwagę zwrócono na oddziaływanie:

- składu środowiska reakcji, np. obecności białek w serwatce lub w permeacie po ultrafiltracji (UF) mleka,
- okresowego odbioru GOS ze środowiska reakcji z zastosowaniem ultrafiltracji,
- właściwości środowiska: kwasowości oraz aktywności wody.

## 2. Materiał i metodyka badań

Stosowano preparaty enzymatyczne:

- $\beta$ -galaktozydazę z *Penicillium canescens*, preparat otrzymany w skali laboratoryjnej; w postaci suszonego precipitatu białek wydzielonych acetonem z płynu po hodowli grzybów (9);

–  $\beta$ -galaktozydazę z *Aspergillus oryzae*, preparat handlowy (Sigma, nr katalogowy G5160).

### **2.1. Warunki enzymatycznej modyfikacji laktozy w środowisku jednofazowym**

Wydajność syntezy GOS (procentowy udział w sacharydach ogółem) badano w zależności od:

– rodzaju i składu roztworu substratu (roztwory laktozy w buforach), permeatu po ultrafiltracji mleka (odbiałczony lub nieodbiałczony), serwatki po produkcji serów (odbiałczona lub nieodbiałczona);

– początkowego stężenia laktozy w wymienionych roztworach (5, 10 lub 15%);

– czasu reakcji, próbki roztworów sacharydów po reakcji z  $\beta$ -galaktozydazą pobierano co godzinę;

– kwasowości środowiska pH 4,5, 5,0, 7,0.

Reakcje prowadzono w 45°C, stosowana dawka enzymu 40 U/gram laktozy. Po reakcji enzym inaktywowano w warunkach opisanych poprzednio (10).

### **2.2. Warunki enzymatycznej modyfikacji laktozy w środowisku dwufazowym, rozpuszczalniki organiczne : faza wodna**

W tym etapie badań wydajność syntezy galaktooligosacharydów oceniano w zależności od:

– rodzaju rozpuszczalnika organicznego: cykloheksan, heksan lub toluen,

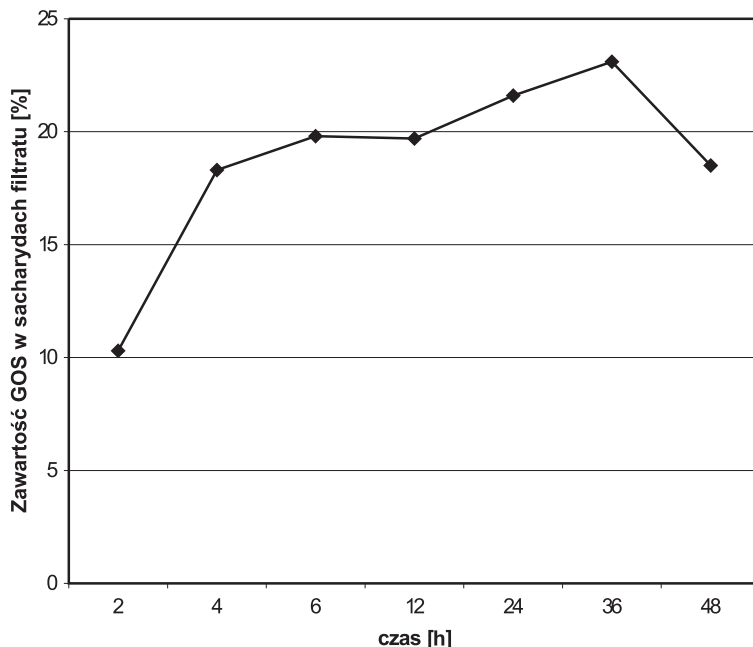
– zawartości wody w środowisku reakcji: 2, 5, 7 lub 10% i dopełniającej (do 100%) zawartości rozpuszczalnika organicznego,

– początkowej zawartości laktozy w fazie wodnej jak w rozdz. 2.1.

### **2.3. Warunki procesu syntezy GOS z ich wydzieleniem techniką ultrafiltracji**

W tym wariantcie eksperymentu zastosowano moduł laboratoryjny z membraną ceramiczną (TAMI Industries) o granicy rozdziału – 8 kDa. Proces prowadzono w 200 ml roztworu odbiałczonego permeatu po ultrafiltracji (UF) mleka o zawartości laktozy – 15% z 0,02% v/v dodatkiem 30% roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Po ogrzaniu do 45°C dodawano preparat  $\beta$ -galaktozydazy z *P. canescens* w dawce 40 U/1g laktozy i podawano roztwór substratu pompą do modułu z membraną. W początkowym okresie (do 60 min) proces prowadzono bez odbioru filtratu. Następnie próbki filtratu pobierano w ustalonych odstępach czasu oraz doprowadzano nowe porcje roztworu substratu w celu uzupełnienia układu do objętości początkowej. W próbkach filtratu oznaczano zawartość sacharydów stosując HPLC.



Rys. 1. Wpływ czasu reakcji laktozy z enzymem na zawartość GOS w próbkach filtratu wydzielanych metodą ultrafiltracji; warunki procesu: reakcję prowadzono w odbiałczonym permeacie po UF mleka, pH 4,5, początkowe stężenie laktozy 15%, temp. 45°C, dawka  $\beta$ -galaktozydazy z *P. canescens* 40 U/1g substratu.

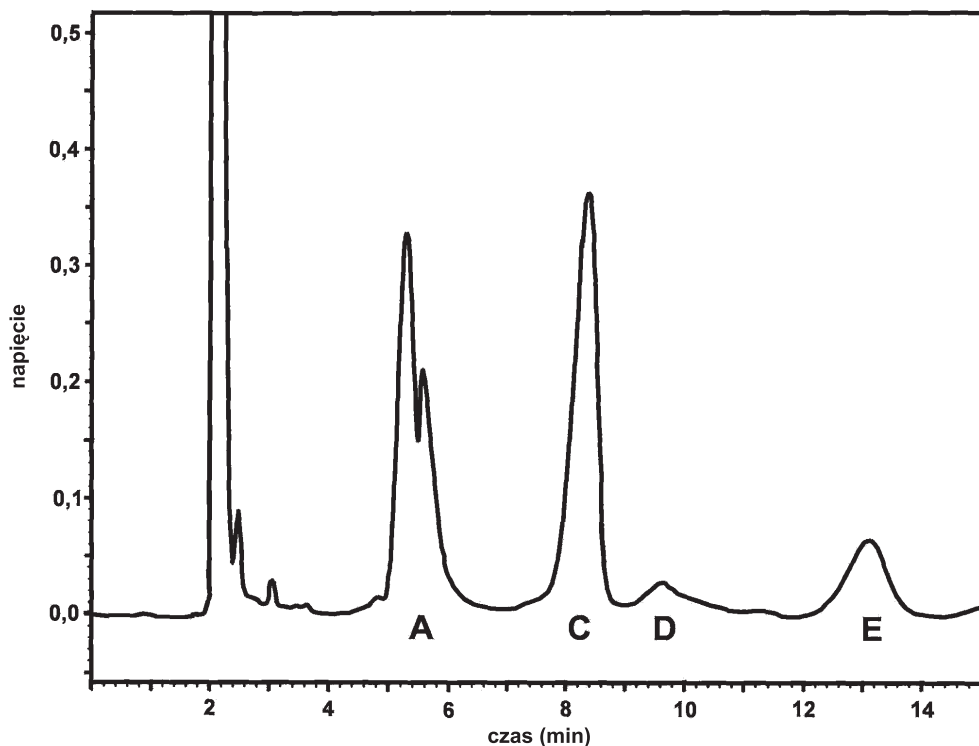
## 2.4. Metodyka analityczna

### 2.4.1. Oznaczanie aktywności $\beta$ -galaktozydazy

W tym celu zastosowano pomiar spektrofotometryczny ilości o-nitrofenolu uwolnionego z o-nitro-fenyl- $\beta$ -D-galaktopyranozydu (ONPG) przez  $\beta$ -galaktozydazę. Za jednostkę aktywności  $\beta$ -galaktozydazy przyjęto dawkę enzymu, która w warunkach oznaczenia (temp. 45°C, pH 4,5, czas reakcji 10 min) uwalnia 1  $\mu$ mol o-nitrofenolu / minutę.

### 2.4.2. Oznaczanie zawartości sacharydów

W tym celu stosowano metodę HPLC (warunki oznaczenia opisano poprzednio (10)). Zastosowano następujące wzorce sacharydów: 4-O-(3-O  $\alpha$ -D-galaktopyranozylo- $\beta$ -D-galaktopyranozylo)-D-galaktopyranoza) Sigma; 6-O- $\beta$ -D-galaktopyranozylo-D-galaktoza (Sigma), galaktoza (Merck), glukoza (POCH S.A. Gliwice), laktoza (POCH S.A.



Rys. 2. Chromatogram z rozdzielu sacharydów otrzymanych po reakcji katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę z *Penicillium canescens*; warunki reakcji: 15% roztwór laktozy w buforze octanowym o pH 4,5, czas reakcji 3 h. A – glukoza i galaktoza; C – laktoza; D – disacharyd Gal-Gal (6-0- $\beta$ -D-galaktopyranozylo-D-galaktoza); E – galaktotrioza (4-0-(3-0- $\alpha$ -D-galaktopyranozylo- $\beta$ -D-galaktopyranozylo)-D-galaktopyranoza).

Gliwice). Przykład chromatogramu sacharydów po reakcji laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą z *P. canescens* przedstawiono na rysunku 2.

#### 2.4.3. Zawartość wody w środowisku reakcji laktozy z $\beta$ -galaktozydazą oznaczano metodą Karla Fischera (11).

### 3. Omówienie oraz dyskusja wyników

Jedną z możliwości postępu w biokatalizie jest pozyskiwanie nowych enzymów, głównie z mikroorganizmów. W tym celu opracowano skład podłoża oraz warunki otrzymywania preparatu  $\beta$ -galaktozydazy syntetyzowanej przez *Penicillium canescens* (9).

W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczących zastosowania otrzymanego preparatu w syntezie galaktooligosacharydów w środowisku wodnym, jednofazo-

wym lub dwufazowym woda : rozpuszczalnik organiczny. Wydajność syntezy GOS w reakcji z preparatem  $\beta$ -galaktozydazy z *P. canescens* porównywano z efektami reakcji laktozy z enzymem z *Aspergillus oryzae* prowadzonej w tych samych warunkach.

### 3.1. Otrzymywanie galaktooligosacharydów w środowisku jednofazowym

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wskazuje się, że zastosowane preparaty  $\beta$ -galaktozydazy w określonych warunkach syntetyzują galaktooligosacharydy. Wydajność syntezy GOS przez porównywane preparaty enzymatyczne jest podobna i zależy głównie od początkowej zawartości laktozy w roztworze, od jego składu i kwasowości, a także od czasu procesu (tab. 1 i 2).

**Tabela 1**

**Wpływ czasu procesu i stężenia laktozy na wydajność reakcji syntezy GOS katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens* lub *A. oryzae***

Źródło $\beta$ -galaktozydazy	Stężenie laktozy <sup>(*)</sup> (%)	Czas (h)	Zawartość sacharydów (mg/ml)				Zawartość GOS (%)
			Gal i Glc	Laktoza	Gal-Gal	Galaktotrioza	
<i>Penicillium canescens</i>	5	3	18,1	43,4	0,0	5,6	8,3
		4	21,8	46,5	0,0	6,0	8,1
		5	25,0	42,0	0,0	5,4	7,5
	10	3	38,7	61,0	0,0	16,7	14,3
		4	43,3	60,3	0,0	16,6	13,8
		5	48,2	55,4	0,0	14,8	12,5
	15	3	64,7	73,3	10,5	27,2	21,5
		4	77,4	68,1	5,7	28,0	18,8
		5	96,1	53,3	3,7	25,6	16,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	5	1	38,6	25,4	2,1	2,9	7,2
		2	54,1	12,3	1,9	2,0	5,5
		3	58,5	13,2	1,3	1,4	3,6
	10	1	60,4	33,7	4,4	7,8	11,5
		2	75,5	25,8	4,2	3,2	6,8
		3	78,0	21,2	4,1	1,0	4,9
	15	1	96,0	40,2	9,2	10,1	12,4
		2	135,9	22,1	4,6	6,7	6,7
		3	140,1	20,9	3,5	4,4	4,7

(\*) – w buforze octanowym pH 4,5. Stosowano dawkę enzymu 40 U/1 g laktozy, temp. procesu 45°C.

Tabela 2

**Wpływ składu i kwasowości (pH) roztworu laktozy na wydajność reakcji syntezy GOS katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens* lub *A. oryzae***

Źródło $\beta$ -galaktozydazy	Laktoza w	Kwasowość (pH)	Zawartość sacharydów (mg/ml)				Zawartość GOS (%)
			Gal i Glc	Laktoza	Gal-Gal	Galaktotrioza	
<i>Penicillium canescens</i> *	A	4,5	64,7	73,3	10,5	27,2	21,5
	A	5,5	26,1	117,3	0,0	26,3	15,5
	B	7,0	17,0	128,9	0,0	19,3	11,7
	C	6,1	41,5	101,3	0,0	24,8	14,8
	C'	5,5	49,1	99,4	0,0	22,8	13,3
	D	5,9	43,3	106,2	0,0	26,5	15,1
	D'	5,5	41,2	95,6	0,0	21,9	13,8
<i>Aspergillus oryzae</i> **	A	4,5	135,9	22,1	4,6	6,7	6,7
	A	5,5	98,5	50,9	5,8	10,6	9,9
	B	7,0	67,1	80,3	4,8	9,0	8,6
	C	6,1	88,1	45,3	4,1	18,9	14,7
	C'	5,5	77,6	58,5	5,7	17,2	14,4
	D	5,9	70,0	60,6	6,5	22,6	18,2
	D'	5,5	48,0	88,7	4,9	22,7	16,8

Gdzie: A – bufor octanowy, B – bufor fosforanowy, C – permeat nieodbiałczony, C' – permeat odbiałczony, D – serwatka nieodbiałczona, D' – serwatka odbiałczona. \*czas reakcji – 3 h; \*\* czas reakcji – 2 h; temp. 45°C, stężenie laktozy 15%, dawka enzymu 40 U/1g laktozy w medium.

Na uwagę zasługuje zależność wydajności syntezy GOS przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens* od kwasowości środowiska. Po reakcji prowadzonej w roztworze laktozy w buforze octanowym o pH 4,5 otrzymano zawartość GOS w sacharydach ogółem 21,5% wobec 15,5% po reakcji w środowisku o pH 5,5. Podobna zmiana kwasowości środowiska reakcji laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą z *A. oryzae* w mniejszym stopniu zadecydowała o udziale GOS w sacharydach (tab. 2). Należy zaznaczyć, że preparat  $\beta$ -galaktozydazy z *P. canescens* wykazuje najkorzystniejszą aktywność w reakcji z ONPG również w środowisku o kwasowości odpowiadającej pH 4,5 (9). Godne podkreślenia jest to, że oceniany zakres zmian kwasowości jest zbliżony do naturalnego odczynu serwatki lub permeatu po jej ultrafiltracji, tj. potencjalnych surowców do prowadzenia syntezy GOS w warunkach przemysłowych.

W procesie katalizowanym przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens* prowadzonym przez 3 godziny w roztworze laktozy w buforze octanowym (pH 4,5) zawartość GOS w mieszaninie sacharydów po reakcji była istotnie zależna od początkowej koncen-

tracji laktozy (tab. 1). Wydajność syntezy GOS zarówno przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens*, jak i *A. oryzae* zależała także od czasu reakcji. Udział GOS w mieszaninie sacharydów był niestabilny i zmniejszał się wraz z czasem reakcji z enzymem (tab. 1).

Podwyższone stężenie substratu w środowisku ułatwia zgodnie z prawem zachowania mas przesunięcie położenia równowagi reakcji z hydrolizy laktozy na syntezę GOS (12). Stan równowagi reakcji jest niestabilny w czasie i wpływa na wydajność syntezy GOS.

Według Petzelbauera i wsp. (13) w początkowym etapie procesu, laktoza będąc w nadmiarze wobec glukozy i galaktozy jest głównym akceptorem reszt galaktozylowych, co sprzyja syntezie GOS.

Z postępowaniem reakcji enzymatycznej zwiększa się udział produktów hydrolizy laktozy w mieszaninie sacharydów, co niekorzystnie oddziałuje na wydajność syntezy GOS (14).

Z badań innych autorów (15) wynika, że wraz z wydłużeniem czasu reakcji może dochodzić do wtórnej degradacji GOS i do zmniejszenia ich udziału w środowisku reakcji. Badając wpływ składu i właściwości roztworu laktozy na wydajność syntezy GOS wykazano, że najkorzystniejszy ich udział w sacharydach po reakcji katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens* można otrzymać w roztworze laktozy w buforze octanowym o pH 4,5. Syntezie GOS przez  $\beta$ -galaktozydazę z *A. oryzae* sprzyjało środowisko nieodbiałzonej serwatki – zawartość GOS w otrzymanych sacharydach wynosiła 18,2% (tab. 2). Oceniając wpływ odbiałczenia serwatki lub permeatu po UF mleka na wydajność syntezy GOS wykazano, że obecność białek w środowisku reakcji w niewielkim stopniu o tym decyduje (tab. 2).

Wpływ zawartości białek w środowisku na efekty reakcji laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą zależy od jej źródła i właściwości. Potwierdzeniem tego jest korzystne oddziaływanie kazeiny i białek serwatkowych na aktywność  $\beta$ -galaktozydazy z *K. fragilis* (16) oraz wyniki badań Cho i wsp. (12) którzy stosując  $\beta$ -galaktozydazę z *Bullera singulans* korzystniejszą o 25% wydajność syntezy GOS uzyskali w roztworze laktozy w buforze fosforanowym niż w serwatce.

Różnice wydajności syntezy GOS w roztworach laktozy w buforach i w serwatce mogą być spowodowane niekorzystnym oddziaływaniem na aktywność  $\beta$ -galaktozydazy obecnych w serwatce soli mleka, głównie  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Na}^+$  (17). Niekorzystny wpływ tych kationów na aktywność preparatu  $\beta$ -galaktozydazy w reakcji z ONPG wykazano w naszych wcześniejszych badaniach (10).

W celu udoskonalenia procesu enzymatycznego otrzymywania GOS zastosowano technikę ultrafiltracji (UF) do okresowego wydzielania produktów reakcji laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą z *P. canescens*. Proces prowadzono w odbiałczonym i zagęszczonym permeacie po UF mleka (zawartość laktozy – 15%). Zastosowanie UF do wydzielania sacharydów umożliwia utrzymywanie względnie wysokiej wydajności syntezy GOS. Ich udział w produktach reakcji prowadzonej przez 48 godzin mieścił się w granicach od 10,3% po 2 h do 23,1% po 36 h (rys. 1). Korzystnej wydajności synte-



zy GOS sprzyja ograniczany czasowo kontakt produktów reakcji laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą zatrzymywaną przez membranę. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wskazuje się możliwość wielokrotnego wykorzystania enzymu w syntezie GOS w kolejnych porcjach permeatu okresowo dostarczanego do modułu.

Wydzielone techniką ultrafiltracji roztwory produktów reakcji  $\beta$ -galaktozydazy z laktozą można frakcjonować i zagęszczać z zastosowaniem nanofiltracji i odwróconej osmozy. Zaproponowana technologia jest prosta i możliwa do wdrożenia w skali przemysłowej. Daje szansę atrakcyjnego zagospodarowania produktów ubocznych przemysłu mleczarskiego. Produkowane w ten sposób koncentraty oligosacharydów o właściwościach prebiotycznych można rozpatrywać jako dodatek do żywności lub pasz.

### 3.2. Otrzymywanie galaktooligosacharydów w środowisku dwufazowym

Przesunięcie stanu równowagi reakcji z kierunku hydrolizy laktozy w stronę syntezy galaktooligosacharydów jest ułatwione po zmniejszeniu aktywności wody w środowisku. Jedną z możliwości w tym zakresie jest zastosowanie rozpuszczalników organicznych. W doborze rozpuszczalników uwzględnia się ich różne oddziaływanie z białkiem enzymów, np. ich stabilizację lub destabilizację, zmianę szybkości biokatalizy oraz zmiany położenia stanu równowagi reakcji enzymatycznej (18). Ważnym kryterium oceny przydatności rozpuszczalników jest ich ograniczone mieszanie się z wodą oraz zminimalizowane oddziaływanie na warstwę wody niezbędnej enzymowi w katalizowanej reakcji (19).

Syntezę GOS przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens* lub *A. oryzae* prowadzono w środowisku dwufazowym, rozpuszczalnik organiczny : woda. Oceniano wydajność syntezy GOS w zależności od: rodzaju rozpuszczalnika, zawartości wody w środowisku reakcji, początkowego stężenia laktozy w fazie wodnej, czasu reakcji enzymatycznej oraz kwasowości środowiska.

Po porównaniu efektów procesu enzymatycznego formowania GOS prowadzonego w środowisku jednofazowym oraz dwufazowym stwierdzono, że zmniejszenie aktywności wody w środowisku pozwala otrzymać korzystną zawartość GOS w mieszaninie sacharydów (24%) po reakcji laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą z *P. canescens* w środowisku, w którym faza cykloheksanu stanowiła 98%, a faza wodna 2% (początkowe stężenie laktozy – 10%, pH 4,5, czas reakcji 2 h). Po procesie prowadzonym w środowisku dwufazowym z toluenem lub heksanem zawartości GOS w produktach reakcji laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą z *P. canescens* były śladowe (tab. 3).

Prowadzenie procesu w układach dwufazowych z cykloheksanem, heksanem lub toluenem z zastosowaniem  $\beta$ -galaktozydazy z *A. oryzae* pozwoliło otrzymać zawartość GOS w produktach reakcji od 13,3 do 17,3% (tab. 3). Na podstawie otrzymanych wyników potwierdza się różne oddziaływanie składu środowiska dwufazowego, w tym głównie rozpuszczalników organicznych na właściwości biokatalityczne sto-

sowanych preparatów  $\beta$ -galaktozydazy. Porównując efekty syntezy GOS przez oceniane preparaty  $\beta$ -galaktozydazy wykazano, że enzym z *A. oryzae* syntetyzuje GOS w środowisku dwufazowym z udziałem cykloheksanu lub heksanu lub toluenu, a enzym z *P. canescens* jedynie w środowisku z cykloheksanem.

Tabela 3

## Wpływ składu środowiska i warunków reakcji na enzymatyczną syntezę GOS

Źródło $\beta$ -galaktozydazy	Skład medium i warunki reakcji					Zawartość GOS (%)
	Rozpuszczalnik organiczny (%)	Woda (%)	Zawartość laktozy <sup>2</sup> (%)	Kwasowość <sup>2</sup> (pH)	Czas <sup>3</sup> (h)	
<i>Penicillium canescens</i>	–	100	15	4,5	3	21,5
	cykloheksan – 98	2	10	4,5	2	24,0
	heksan – 98	2	10	4,5	2	ślady
	toluen – 98	2	10	4,5	2	ślady
<i>Aspergillus oryzae</i>	–	100	15	5,5	1	13,3
	cykloheksan – 93	7	15	5,5	1	17,3
	heksan – 90	10	10	5,5	1	16,7
	toluen – 90	10	15	5,5	1	14,3

<sup>1</sup> temperatura 45°C, dawka enzymu 40 U/1 g laktozy; <sup>2</sup> dotyczy fazy wodnej (roztworu laktozy w buforze octanowym); <sup>3</sup> najkorzystniejszy czas reakcji.

O zawartości GOS w produktach enzymatycznej transgalaktozylacji laktozy w środowiskach dwufazowych decydują także: stężenie początkowe substratu, kwasowość i czas reakcji (tab. 3), a także zawartość wody (tab. 4). W reakcji katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens* stwierdzono zależność zmniejszania się udziału GOS w otrzymywanej mieszaninie sacharydów wraz ze zwiększaniem w środowisku reakcji zawartości wody z 2 do 10% (tab. 4).

Tabela 4

Wpływ zawartości wody w środowisku reakcji katalizowanej przez preparat  $\beta$ -galaktozydazy z *P. canescens* na skład i zawartość sacharydów

Skład medium dwufazowego		Zawartość sacharydów (mg/ml)				Zawartość GOS (%)
Udział w %		Glc i Gal	Laktoza	Gal-Gal	Galaktotrioza	
Cykloheksan	Faza wodna*					
1	2	3	4	5	6	7
98	2	3,6	74,8	0,0	24,8	24,0
95	5	5,3	73,3	9,3	13,8	22,7

1	2	3	4	5	6	7
93	7	11,7	74,6	0,0	21,1	19,6
90	10	12,8	86,1	0,0	21,4	17,8

Reakcja prowadzona w 45°C, zawartość laktozy 10%, czas reakcji 2 h, dawka enzymu 40 U/1 g laktozy; \* roztwór laktozy w buforze octanowym pH 4,5.

#### 4. Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że otrzymany w Katedrze Biotechnologii Żywności UWM w Olsztynie preparat  $\beta$ -galaktozydazy z *Penicillium canescens* katalizuje reakcję syntezy galaktooligosacharydów (GOS). Wydajność oraz dynamika syntezy GOS zależy głównie od początkowego stężenia laktozy oraz składu i właściwości jej roztworu.

W reakcji katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę z *P. canescens* korzystną zawartość GOS (21,5% sacharydów w próbce) otrzymano w procesie przeprowadzonym w 15% roztworze laktozy w buforze octanowym o pH 4,5 (rys. 2).

Oceniane preparaty  $\beta$ -galaktozydazy można zastosować w reakcji syntezy GOS prowadzonej w serwatce lub w permeacie po UF mleka (zarówno odbiałczonych jak i nieodbiałczonych). Korzystnej wydajności syntezy GOS w serwatce lub w permeacie po UF mleka sprzyja okresowe ich wydzielanie ze środowiska reakcji z zastosowaniem technik membranowych.

Opracowaną procedurę można zaproponować do zastosowania w przemysłowej produkcji koncentratów GOS z jednoczesnym zagospodarowaniem produktów ubocznych przemysłu mleczarskiego.

Prowadząc proces enzymatycznej modyfikacji laktozy w środowiskach dwufazowych (faza wodna : rozpuszczalnik organiczny) stwierdzono, że udział GOS w mieszaninie sacharydów po reakcji z  $\beta$ -galaktozydazą z *P. canescens* zależy od zawartości wody w środowisku. Wydajność enzymatycznej syntezy GOS w środowiskach dwufazowych zależy także od źródła i właściwości preparatu  $\beta$ -galaktozydazy oraz od rodzaju stosowanego rozpuszczalnika organicznego.

#### Literatura

1. Demczuk A., Bednarski W., Kowalewska-Piontas J., (2004), *Biotechnologia*, 3, (66), 152-165.
2. Gopal P. K., Sullivan P. A., Smart J. B., (2001), *International Dairy Journal*, 11, 19-25.
3. Chen Shao-Xin, Wei Dong-Zhi, Hu Zhen-Hua., (2001), *J. Molecular Catalysis B, Enzymatic*, 16, 109-114.
4. Bielecki S., Buchowiecka A., Gajewska M., (1999), *Biotechnologia*, 1, (44), 67-83.
5. Endo Y. M., Koizumi S., (2000), *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 536-541.
6. Montero A., Alonso J., Canada F. J., Fernandez-Mayoralas A., (1998), *Carbohydrate Research*, 350, 383-391.

7. Kim C. S., Ji E. S., Oh D. K., (2004), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316, 738-743.
8. Mahoney R. R., (1998), *Food Chemistry*, 63, 2, 147-154.
9. Kulikowska A., (2006), *Znaczenie właściwości preparatu  $\beta$ -galaktozydazy z *Penillium canescens* oraz warunków biokatalizy w otrzymywaniu galaktooligosacharydów*, praca doktorska, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn.
10. Kowalewska-Piontas J., Demczuk A., Bednarski W., Amarowicz R., (2003), *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 68/2 (6), 481-484.
11. Bruttel P., Schlink R., (2003), *Metron Monograph*, 8.026.5003, 1-81.
12. Cho Y. I., Shin H. J., Bucke C., (2003), *Biotechnology Letters*, 25, 2107-2111.
13. Petzelbauer J., Zeleny R., Reiter A., Kulbe K. D., Nidetzky B., (2000), *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 2, 140-149.
14. Boon M. A., Janssen A. E. M., van't Riet K., (2000), *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 271-281.
15. Nilsson K. G. J., (1998), *Trends in Biotechnology*, 6, 256-264.
16. Mahoney R. R., Adamchuck C., (1980), *J. of Food Sci.*, 45, 962-968.
17. Rustom I. Y. S., Foda M. I., Lopez-Leiva M. H., (1998), *Food Chemistry*, 62, 2, 141-147.
18. Antczak T., Szczęsna-Antczak M., (2003), *Biotechnologia*, 3, 139-158.
19. Laone C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 81-87.