

## PREBIOTICKÝ ÚČINEK GALAKTOOLIGOSACHARIDŮ A VYUŽITÍ LAKTOSY PRO JEJICH PRODUKCI

JANA RUDOLFOVÁ a LADISLAV ČURDA

Ústav technologie mléka a tuků, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
ladislav.curda@vscht.cz

Došlo 29.4.04, přepracováno 25.11.04, přijato 6.12.04.

Klíčová slova: DOPLNIT

### Obsah

1. Úvod
2. Probiotika, jejich vliv na konzumenta a látky ovlivňující jejich životaschopnost a aktivitu
  - 2.1. Růstové faktory
  - 2.2. Prebiotika a jejich účinek
3. Nestravitelné oligosacharidy
  - 3.1. Laktulosa, laktitol, kyselina laktobionová
  - 3.2. Fruktooligosacharidy
  - 3.3. Galaktooligosacharidy
4. Hydrolyza laktosy a transgalaktosylace
  - 4.1. Hydrolyza laktosy, laktosová intolerance
  - 4.2. Transgalaktosylace, podmínky pro produkci galaktooligosacharidů
    - 4.2.1. Vliv koncentrace laktosy
    - 4.2.2. Vliv zdroje a koncentrace enzymu
    - 4.2.3. Vliv pH a teploty
    - 4.2.4. Vliv přítomnosti různých minerálních látek
    - 4.2.5. Vliv imobilizace
5. Využití nestravitelných oligosacharidů v mlékárenské technologii

### 1. Úvod

Funkční potraviny jsou jednou z oblastí potravinářského průmyslu s největší dynamikou růstu. Přímou nebo preventivně ovlivňují zdraví konzumenta, a tím jsou pro spotřebitele atraktivní. Mezi takové potraviny patří také ty, jež obsahují probiotické kultury nebo prebiotické sacharidy. Slovo probiotikum pochází z řeckého pro bios (pro život) a používá se pro živé mikroorganismy (převážně bakterie mléčného kvašení), které pozitivně ovlivňují složení a vlastnosti střevní mikroflóry konzumenta. Prebiotika jsou naproti tomu nestravitelné složky potravy (převážně komplexní cukry), které selektivně stimulují růst nebo aktivitu některých kultur střevní mikroflóry (prebiotik). Na rozdíl od růstových faktorů, které podporují růst a životaschopnost mikroorganismů *in vitro* (při kultivaci v laboratoři), prebiotika působí *in vivo* (přímou v tlustém střevě). Zřejmě prvním prebiotikem, se kterým

se lidský organismus setká, je laktosa (mléčný disacharid složený z glukosy a galaktosy). Mateřské mléko má vysoký obsah laktosy (více než 7 %), všechna nemůže být hydrolyzována a metabolizována v tenkém střevě, velká část se dostává do tlustého střeva a slouží k výživě probiotických mikroorganismů, bifidobakterií a laktobacilů. Laktosa může být také surovinou pro produkci dalších prebiotických sacharidů, čehož by se mohlo využít při zpracování syrovátky, jejíž hlavní složkou je právě laktosa (70 % sušiny). Při výrobě sýrů se totiž ročně vyprodukuje na celém světě více než 150 mil tun syrovátky (na 1 kg sýra připadá průměrně 10 l syrovátky) a celosvětová produkce sýrů neustále stoupá. Syrovátka je málo využitá, vyrábí se z ní koncentráty syrovátkových bílkovin (WPC) a jinak bývá zkrmována hospodářskými zvířaty.

### 2. Probiotika, jejich vliv na konzumenta a látky ovlivňující jejich životaschopnost a aktivitu

Bakterie mléčného kvašení, zvláště bifidobakterie, vstupující do organismu při konzumaci kysaných mléčných výrobků, přežívají v nezanedbatelném počtu v prostředí trávicího traktu (jsou tolerantní vůči kyselému prostředí a žlučovým solím) a jejich produkty mají různé zdraví prospěšné vlastnosti<sup>1</sup>. Bifidogenní mikroflóra zajišťuje  $\beta$ -oxidací hydrolyzu prebiotik na monomerní jednotky a v druhé fázi je metabolizuje na těkavé mastné kyseliny (octovou, propionovou, mléčnou, máselnou) a plyny<sup>2</sup> ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ). Vznikající krátké řetězce mastných kyselin jsou nejen zdrojem energie, ale stimulují také střevní peristaltiku a kyselina máselná má navíc ochranný vliv na buňky intestinální mukosy. Kyselina octová a mléčná snižují pH a v důsledku toho se zlepšuje absorpce některých minerálů (železo, vápník) ve střevě a klesá počet patogenních mikroorganismů (*Clostridium perfringens*), které kyselé prostředí nesnášejí. Následně se snižuje také obsah hnilobných produktů v moči a stolici a předchází se průjmům. Některé kmeny *Lactobacillus acidophilus* asimilují cholesterol z prostředí, jiné zase inhibují absorpci cholesterolových micel střevní stěnou, a tak se snižuje obsah cholesterolu v krevním séru. Nezanedbatelná je také produkce vitaminů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, kyselin nikotinové a listové<sup>1-4</sup>. V rámci celoevropského projektu s názvem Demonstration of the Nutritional Functionality of Probiotic Foods (zkráceně PROBDEMO) byla potvrzena stimulace imunitního systému i zmírnění projevů alergických reakcí na jídlo včetně atopických ekzémů<sup>5</sup>. Lourens-Hattingh a Viljoen<sup>6</sup> uvádějí pro zajištění pozitivního účinku denní příjem  $1.10^8$ – $1.10^9$  JTK.ml<sup>-1</sup> (jednotek tvořících kolonie v 1 ml) živých probiotických buněk, což odpovídá konzumaci 100 g výrobku s obsahem  $1.10^6$ – $1.10^7$  JTK.ml<sup>-1</sup> denně. Pozitivní účinky (např. imunostimulace) mohou mít

také výrobky s obsahem neživé kultury<sup>5</sup>. Některé kmeny velmi rychle rostou v první fázi výroby, ale v průběhu skladování rychle odumírají. Vlastnosti a účinek probiotické kultury bývá také ovlivněn typem a vlastnostmi kyselové kultury (hlavně metabolity). Často je opomíjena také možnost využití kvasinek jako probiotik. Například *Saccharomyces cerevisiae* prochází zaživacím traktem a působí v tlustém střevě proti *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*. Kvasinky jsou schopné metabolizovat galaktosu, která se při metabolismu laktosy hromadí v prostředí, nevadí jim nízké pH a využívají organické kyseliny. Proto jsou pro ně kysané mléčné výrobky velmi vhodným prostředím a některé jsou na těchto poznicích přímo založeny (kumys, kefir)<sup>6</sup>.

### 2.1. Růstové faktory

Bifidobakterie jsou citlivé na kyslík a kyselé prostředí, proto je jejich životaschopnost v mléčných výrobcích velmi omezená. Látky, které ji zlepšují, jsou tzv. růstové faktory<sup>7,8</sup> a patří mezi ně například  $\kappa$ -kasein,  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, kvasničný extrakt, threonin, cystein, pepton, dextrin, maltosa a hydrolyzáty kaseinu. Kaseinomakropeptid (CMP) obsažený v hydrolyzátech syrovátkových bílkovin (WPC) je lepším růstovým faktorem, než čistý CMP (cit.<sup>9</sup>). Významnými růstovými faktory jsou galaktooligosacharidy (GOS), inulin, rafinosa nebo fruktooligosacharidy (FOS), které jsou zároveň také prebiotiky. GOS jsou pro bifidobakterie kultivované *in vitro* lepší substrát než laktulosa či rafinosa<sup>10</sup>. Výborným médiem pro bifidobakterie je sojové mléko obsahující sacharosu, rafinosu a stachyosu<sup>11</sup>, proto se vyrábí jogurt ze sojového mléka zakysaný standardní jogurtovou kulturou s přidávkou bifidobakterií. Výsledek je dvojnásobný – konzument přijímá probiotika a senzorycké vlastnosti sojového mléka se fermentací výrazně zlepšují.

### 2.2. Prebiotika a jejich účinek

Novorozenci nemají v zaživacím traktu žádné mikroorganismy<sup>1</sup>, kolonizace enterokoky, klostridii, koliformními bakteriemi a laktobacily začíná krátce po narození. Ke konci prvního týdne již převládají bifidobakterie a u kojených dětí tvoří až 85 % intestinální flóry. Nekojené děti mají o řád nižší počty bifidobakterií a o to vyšší obsah enterokoků a streptokoků<sup>10,12</sup>. V průběhu dospívání a stárnutí začínou v zaživacím traktu převládat příslušníci rodu *Bacteroides* a *Eubacterium* a bifidobakterie jsou až 3. nebo 4. nejrozšířenější skupinou mikroorganismů<sup>7,13</sup>. Tyto údaje ukazují na funkci složek mateřského mléka jako bifidogenního faktoru (podporují růst bifidobakterií v tlustém střevě). Oligosacharidy mateřského mléka<sup>2</sup> obsahují převážně pět základních složek – kyselinu sialovou, *N*-acetylglukosamin, L-fukosu, D-glukosu a D-galaktosu<sup>2,13</sup>. Frakce s těmito sloučeninami lze získat po trypsinovém nebo chymotrypsinovém srážení kaseinu a syrovátkových bílkovin mateřského mléka<sup>13</sup>. V průběhu kojení se z těchto komponent syntetizují oligosacharidy, ale jejich složení není vždy stejné. Během 1. měsíce obsahuje mateřské mléko přibližně 24 % galaktooligosacharidů z celkového obsahu cukrů a po 2 měsících již pouze 15 %. Stále jsou ale po laktose a lipidech nejvíce zastoupenou složkou mateřského mléka. Proč se jejich složení mění, není zcela jasné, ale v rozvoji specifické intestinální mikroflóry kojených dětí hrají důležitou roli<sup>2</sup>, čímž nepřímo snižují riziko infekce (jejich metabolizováním se snižuje pH ve střevě a počty patogenních mikroorganismů). Oligosacharidy mají také přímou účinnost proti enteropatogenům, protože slouží jako vazebná místa pro jejich toxiny, které se potom nemohou vázat na střevní stěnu. Zvláště v prvních dnech a týdnech kojení je tato ochrana před infekcí velmi důležitá, protože imunitní systém teprve vzniká a nedostatečně kyselé pH žaludku není přirozenou ochranou. Při metabolismu oligosacharidů mateřského mléka se uvolňuje velké množství

Tabulka I

Nárůst (+), pokles (–), případně žádná změna (0) v počtech mikroorganismů během fermentace prebiotik střevní mikroflórou *in vitro* (cit.<sup>16</sup>); Bif – bifidobakterie, Bac – *Bacteroides*, Lac – laktobacily, Clos – klostridia, FOS – fruktooligosacharidy, IMO – isomaltooligosacharidy, GOS – galaktooligosacharidy

Prebiotika	pH	Dávka prebiotika [g.l <sup>-1</sup> ]							
		10				20			
		Bif	Bac	Lac	Clos	Bif	Bac	Lac	Clos
FOS	6	+	–	0	+	+	–	–	+
	6,8	+	–	0	0	+	+	–	+
Inulin	6	+	0	0	+	+	0	0	+
	6,8	+	–	0	0	+	0	–	+
IMO	6	+	–	0	+	+	–	0	+
	6,8	+	–	–	–	+	–	0	+
GOS	6	+	–	+	+	+	–	–	+
	6,8	+	–	+	–	+	–	–	+
Laktulosa	6	+	–	0	+	+	–	0	+
	6,8	+	–	0	–	+	+	0	+

kyseliny sialové (zvláště v 1. týdnu laktace jsou velmi aktivní jaterní enzymy zodpovědné za její syntézu v mléce), která je využívána k syntéze mozkových gangliosidů a glykoproteinů, dochází k velkému rozvoji mozku. Složení a struktura oligosacharidů mateřského mléka nemůže být reprodukována, proto jsou hledány a využívány jiné skupiny oligosacharidů s podobným účinkem. Nejvíce jsou používány deriváty laktosy (laktulosa, laktitol, kyselina laktobionová), galaktooligosacharidy (GOS), isomaltooligosacharidy (IMO), fruktooligosacharidy (FOS) a inulin<sup>8,14,15</sup>. Palframan a spol.<sup>16</sup> studovali vliv pH a dávkování těchto prebiotik na střevní mikroflóru (tabulka I). Pro zjišťování počtů bifidobakterií, laktobacilů, klostridií a *Bacteroides* používal fluorescenční hybridizaci *in situ* (FISH). Za všech testovaných podmínek rostly celkové počty mikroorganismů a rostl i počet bifidobakterií.

### 3. Nestravitelné oligosacharidy

Sacharidy je možné klasifikovat podle různých kritérií, podle délky řetězce, podle technologických vlastností, podle fyziologických vlastností. Prebiotika laktulosa, laktitol, fruktooligosacharidy, inulin, xylooligosacharidy a galaktooligosacharidy spadají do skupiny nestravitelných oligosacharidů<sup>15</sup>, přitom podle klasifikace na základě délky řetězce by patřily do různých skupin<sup>17</sup>. Nejsou hydrolyzovány ani absorbovány v tenkém střevě a působí podobně jako rozpustná vláknina<sup>18,19</sup>. V posledních dvou desetiletích se často stávají složkami funkčních potravin<sup>8</sup>, hlavně v Japonsku a v Evropě. Jejich důležitou vlastností je, že hrají roli receptorových analogů, které se zapojují do specifických interakcí mezi bakteriálními patogeny a oligosacharidovými složkami receptorů střevní stěny. Některé nestravitelné oligosacharidy vznikají při potravinářských technologiích, např. xylooligosacharidy najdeme v chlebu a isomaltooligosacharidy v pivu nebo v sojové omáče<sup>15</sup>.

#### 3.1. Laktulosa, laktitol, kyselina laktobionová

Laktulosa (4-*O*- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-D-fruktosa) vzniká izomerací glukosylu v laktose působením zářevu na mléko a je v malém množství přirozenou složkou tepelně ošetřeného mléka a mléčných výrobků. Signifikantní vliv na střevní mikroflóru má až ve větších koncentracích, je proto komerčně produkována zahříváním laktosy za katalýzy např. hydroxidu sodného. Laktitol (4-*O*- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-D-glucitol) vzniká elektrolytickou redukcí, redukcí tetrahydridoboritanem sodným nebo hydrogenací na niklu<sup>13</sup>. Laktulosa i laktitol jsou podávány pacientům s jaterní encefalopatií (intoxikací mozku močovinou v důsledku nefunkčnosti jater) a s chronickou zácpou. Jsou zkvašovány v tlustém střevě intestinální mikroflórou a redukují tvorbu amoniaku<sup>20</sup>. Kyselina laktobionová (4-*O*- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-D-glukonová kyselina) vzniká z laktosy oxidací, má sladkou chuť, nízkou energetickou hodnotu a prebiotické vlastnosti. Používá se do dětských

výživ jako prebiotikum a přidává se i do dalších potravin (sladkosti, žvýkačky, mléčné výrobky, zmrzliny, pečivo)<sup>20,21</sup>. Zatímco laktulosa a kyselina laktobionová v tenkém střevě metabolizovány nejsou, laktitol částečně ano, ale většina je využívána až v tlustém střevě za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem, které jsou absorbovány, slouží jako zdroj energie a ovlivňují metabolismus kyseliny cholové. Laktitol také slouží jako sladidlo pro diabetiky. Laktulosa je v tlustém střevě lépe využívána bifidobakteriemi, než FOS a laktitol, je ale také dobře metabolizována klostridii. Zatímco kojenci mají výskyt bifidobakterií v tlustém střevě 85–88 %, děti krmené kojeneckou výživou s obsahem 2 % laktulosity pouze 67 % (bez laktulosity dokonce jen 20 %). U dospělého člověka způsobí příjem 3 g laktulosity denně kolonizaci střev bifidobakteriemi ze 47 % (cit.<sup>7</sup>).

#### 3.2. Fruktooligosacharidy

Fruktooligosacharidy (FOS) jsou polymery (polymerizační stupeň 2–30) D-fruktosy spojené  $\beta$  (2→1) vazbami zakončené molekulou sacharosy, jsou rostlinného původu (česnečka, cibule, artyčoky, rajčata, česnek, banán) a jejich průměrný obsah v čerstvém ovoci či zelenině je 6 %. Průmyslově se vyrábí buď hydrolýzou inulinu<sup>22</sup> nebo ze sacharosy červené řepy účinkem fruktosylfuranosidasy z *Aspergillus niger* (transfruktosylace)<sup>2,13,15,19,22</sup>. Nejsou využívány patogenními mikroorganismy tlustého střeva (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*) ani *Streptococcus mutans* v ústech (nepřispívají k tvorbě zubního kazu). Při dávkování 3–6 g FOS denně se snižuje produkce toxických složek a nežádoucích enzymů ve střevě o 40–45 %. Pozitivní efekt pro dospělého jedince má dávka 2–10 g.den<sup>-1</sup>, průměrná spotřeba je však pouze 0,8 g.den<sup>-1</sup> (cit.<sup>2</sup>). Jiné zdroje uvádějí pozitivní vliv při dávkování 3 g.den<sup>-1</sup> (cit.<sup>15</sup>) nebo dokonce až 15 g.den<sup>-1</sup> (cit.<sup>23</sup>).

#### 3.3. Galaktooligosacharidy

Galaktooligosacharidy (GOS) jsou živočišného původu (kravské mléko) a průmyslově se vyrábějí z laktosy transgalaktosylací účinkem  $\beta$ -galaktosidasy<sup>22</sup>. Podobně jako FOS působí jako rozpustná vláknina<sup>24–26</sup>. GOS mají kromě fyziologických účinků také významné fyzikálně-chemické vlastnosti. Ve srovnání s monosacharidy mají vyšší molekulovou hmotnost, a tím zvyšují viskozitu výrobků. U mražených produktů ovlivňují bod tuhnutí, u tepelně zpracovávaných potravin omezují hnědnutí v důsledku Maillardových reakcí. Způsobují zádrž vlhkosti, vazbou vody snižují její aktivitu, a tím významně omezují projevy mikrobiální kontaminace výrobků. Mohou být využívány jako inhibitory retrogradace škrobu<sup>17</sup>.

## 4. Hydrolýza laktosy a transgalaktosylace

### 4.1. Hydrolýza laktosy, laktosová intolerance

$\beta$ -Galaktosidasa (EC 3.2.1.23), triviálně nazývaná

Tabulka II  
Výskyt laktosové intolerance v různých oblastech světa<sup>28</sup>

Oblast	Výskyt [%]	Oblast	Výskyt [%]
Skandinávie	1 – 5	Východní Evropa	10 – 20
Západní Evropa	10 – 20	Střední Evropa	15 – 50
Jižní Evropa	50 – 80	Severní Afrika	70 – 80
Jihozápadní Asie	25	Východní Asie	70 – 100
Indiáni	60 – 100	Kanada, Amerika, Austrálie	méně než 30 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Číslo odpovídá výskytu mezi bílým obyvatelstvem

laktasa, katalyzuje hydrolyzu laktosy na monosacharidy D-glukosu a D-galaktosu. Tato reakce je nutným krokem pro správné trávení laktosy a v případě, že laktasa není v zažívacím traktu přítomna nebo nemá dostatečnou aktivitu, projeví se tzv. laktosová intolerance (většinou trávicí potíže, nevolnosti a bolesti hlavy). V dospělé populaci je laktosová intolerance velmi rozšířená po celém světě<sup>27,28</sup> (tabulka II), protože laktasa je indukovatelný enzym a poté, co dítě přestane být kojeno, postupně ztrácí aktivitu. Podmínky a vlivy různých faktorů na enzymovou hydrolyzu laktosy byly podrobně zkoumány, laktasa byla izolována z různých zdrojů (tabulka III) a enzymové preparáty o rozličné čistotě a aktivitě jsou komerčně dostupné. V různých zemích světa (nikoli v České republice) se také vyrábějí mléčné výrobky na bázi hydrolyzované laktosy. Hydrolyzy laktosy v mléce se využívá při výrobě sladkého kondenzovaného mléka, mražených mléčných produktů<sup>29</sup>, dezertu dadih<sup>30</sup> a sýra<sup>31,32</sup>. Mezi výrobky ze syrovátky s hydrolyzovanou laktosou<sup>33</sup> patří mražené smetanové krémy a mražené dezerty, cukrovinky, pekařské produkty<sup>34</sup>, nápoje<sup>35</sup> a kysané produkty<sup>29</sup>. Finská firma Valio Research and Development od konce 70. let uvádí na trh své produkty HYLA s laktosou hydrolyzovanou alespoň z 80 % – mléko, jogurt, kysané mléko, sýr, zmrzlina, syrovátkový nápoj a další<sup>27</sup>.

#### 4.2. Transgalaktosylace, podmínky pro produkci galaktooligosacharidů

Transgalaktosylace je doprovodnou reakcí enzymové hydrolyzy laktosy na glukosu a galaktosu účinkem  $\beta$ -galaktosidasy.  $\beta$ -Galaktosidasa katalyzuje přenos galaktosylu, uvolněného po rozštěpení vazby mezi glukosou a galaktosou, na jiný sacharid přítomný v prostředí. V tom nejjednodušším případě jde o přenos na molekulu vody a vznikne volná galaktosa (hydrolyza). V ostatních případech vznikají di-, tri-, tetra- a pentasacharidy (transgalaktosylace). Vznik vyšších oligosacharidů není znám. Mechanismus reakce je ovlivněn povahou aktivního centra enzymu<sup>38</sup>, množství a typy GOS závisejí na mnoha faktorech<sup>39,40</sup>, mezi něž patří koncentrace substrátu<sup>8,19,26, 41–45</sup> (tabulka IV), zdroj a koncentrace enzymu<sup>19,42,44,45,51</sup>, pH a teplota<sup>19,26,42,46,47</sup> (tabulka V), přítomnost různých minerálních látek<sup>47</sup> a typ reakce<sup>41,43,51</sup> (imobilizace enzymu, membránový reaktor). Transglykosylační vlastnosti enzymů izolovaných z různých mikroorganismů byly zlepšovány mutagenézí případně změnou specifických aminokyselin přítomných v aktivním místě enzymu<sup>48</sup>.

##### 4.2.1. Vliv koncentrace laktosy

Obecně platí, že čím vyšší je počáteční koncentrace laktosy, tím více galaktooligosacharidů v průběhu reakce vzniká<sup>46</sup> (tabulka IV). Hydrolyzy laktosy s plísňovým enzymem byly prováděny v pufru při 40 °C a pH 4. Hydroly-

Tabulka III  
Přehled nejpoužívanějších mikrobiálních zdrojů  $\beta$ -galaktosidas<sup>36,37</sup>

Bakteriální zdroje	Kvasinkové zdroje	Plísňové zdroje
<i>Escherichia coli</i>	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Thermus equaticus</i>	<i>Sporobolomyces singularis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Streptococcus lactis</i>		<i>Aspergillus phoenicis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>		<i>Mucor pusillus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>		<i>Mucor miehei</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>		<i>Neurospora crassa</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		<i>Penicillium simplicissimum</i>

Tabulka IV  
Vliv koncentrace laktosy na výtěžek GOS (galaktooligosacharidů)<sup>26,45</sup>

Původ enzymu	Počáteční koncentrace laktosy [%]	Maximální výtěžek GOS [%]
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	10
<i>Aspergillus oryzae</i>	9	15
<i>Aspergillus oryzae</i>	18	21
<i>Aspergillus oryzae</i>	36	31
<i>Kluyveromyces lactis</i>	5	5
<i>Kluyveromyces lactis</i>	10	8,5
<i>Kluyveromyces lactis</i>	20	12,5

zy laktosy s kvasinkovým enzymem byly prováděny v permeátu po ultrafiltraci syrovátky při 30 °C a pH 7. K výtěžkům 5 % GOS z počáteční koncentrace laktosy 5 % účinkem enzymu z *Kluyveromyces lactis* dospěl také Burvall<sup>49</sup>. Foda a López-Leiva<sup>51</sup> získali se stejným enzymem výtěžek až 18,6 % ze 14 % laktosy a až 22,2 % pro 20 % laktosy na počátku reakce.

#### 4.2.2. Vliv zdroje a koncentrace enzymu

Prenosil uvádí, že každá laktasa z jiného mikrobiálního zdroje vede při použití k unikátnímu spektru galaktooligosacharidů<sup>45</sup>. Nejpoužívanější komerční preparáty jsou buď kvasinkového původu (izolované z *Kluyveromyces lactis* nebo *fragilis*) nebo plísňového původu (izolované z *Aspergillus niger* nebo *oryzae*). Plísňové preparáty tvoří maximum oligosacharidů při dosažení 40–50% hydrolyzy při 50 °C a pH 4,5. Kvasinkové preparáty tvoří maximum oligosacharidů při dosažení 70–80% hydrolyzy při teplotě 37 °C a pH 7. Za stejných podmínek vzniklo nejvíce galaktooligosacharidů při použití enzymu z *Aspergillus oryzae* (17 % trisacharidů a 3,8 % tetrasacharidů)<sup>44</sup>. Boon a spol.<sup>42</sup> porovnávali tři enzymy, enzym z *Bacillus circulans* vedl k vyšším výtěžkům než enzym z *Aspergillus oryzae* a nejmenší výtěžky byly dosaženy s enzymem z *Kluyveromyces spp.* Enzym z *Bacillus circulans* dokonce vedl k nejširšímu spektru galaktooligosacharidů (tri-, tetra- i pentasacharidy). Termostabilní bakteriální β-galaktosidasa ze *Sulfolobus solfataricus* vede ve srovnání s ko-

merční termotolerantní β-galaktosidasou z *Aspergillus oryzae* a termolabilní β-galaktosidasou z *Escherichia coli* k nejvyšším výtěžkům oligosacharidů (48 % vs. 36 % vs. 32 %)<sup>50</sup>. Vliv koncentrace enzymu z *Kluyveromyces lactis* (0,05 a 0,5 %) sledovali Foda a López-Leiva<sup>51</sup> v permeátu po ultrafiltraci mléka při 45 °C a pH 7. V membránovém reaktoru byl při výchozí koncentraci laktosy 20 % výtěžek GOS 22 % při koncentraci enzymu 0,05 % a 31 % GOS při 0,5 % enzymu.

#### 4.2.3. Vliv pH a teploty

Při nižších počátečních koncentracích laktosy (přibližně 5 %) je s enzymem z *Aspergillus oryzae* při pH 7 dosaženo poněkud vyšších výtěžků GOS než při pH 4 a výtěžek naopak klesá s rostoucí teplotou v rozmezí 30 až 60 °C. Při počátečních koncentracích laktosy vyšších než 20 % je vliv pH i teploty minimální<sup>26</sup>. Vyšší výtěžky při vyšším pH potvrdil také Cruz<sup>46</sup> s enzymem z *Penicillium simplicissimum*. Optimum pH tohoto enzymu pro hydrolyzu je 4,0–4,6, avšak nejvyššího výtěžku GOS bylo dosaženo při pH 6,5. Optimální pH pro hydrolyzu laktosy se tak často neshoduje s optimálním pH pro tvorbu galaktooligosacharidů<sup>46,52</sup>. Vliv pH, teploty i zdroje enzymu byl sledován také Rustomem a spol.<sup>19</sup> v permeátu po ultrafiltraci mléka o počáteční koncentraci laktosy 14 % (tabulka V). Podle Prenosila a spol.<sup>44</sup> však nemá pH ani teplota na tvorbu GOS pro enzymy *Aspergillus niger* i *A. oryzae* a *Kluyveromyces lactis* i *K. fragilis* statisticky významný vliv.

#### 4.2.4. Vliv přítomnosti různých minerálních látek

Mahoney<sup>38</sup> uvádí nižší obsah galaktooligosacharidů získaný hydrolyzou laktosy v mléce než v pufru. Chen<sup>53</sup> uvádí podobný závěr, v zahuštěném mléce dosáhl účinkem enzymu z *Aspergillus oryzae* nižších výtěžků galaktooligosacharidů (22,8 %) než v zahuštěném permeátu (27,9 %) o stejné počáteční koncentraci laktosy (16,7 %). Mléko, permeát i pufr obsahují různé minerální látky, některé inhibují aktivitu β-galaktosidasy (například vápník), jiné ji zlepšují (například hořčík)<sup>39</sup>. Podle Garmana<sup>39</sup> by vápník obsažený v mléce velký inhibiční účinek mít neměl, protože je vázaný na kasein. Různé minerální látky neovlivňují typy vznikajících galaktooligosacharidů, ale pouze množství. Mléko, permeát i pufr se ale liší také v obsahu bílkovin, které tvorbu GOS negativně ovlivňují<sup>53</sup>.

Tabulka V  
Vliv zdroje enzymu, teploty a pH na výtěžek GOS (galaktooligosacharidů)<sup>19</sup>

Teplota [°C]	pH	Maximální výtěžek GOS [%]		
		<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
35	5	17,9	13,6	7,9
45	5	15,7	18,6	20,0
35	7	15,7	18,6	17,9
45	7	15,0	16,4	18,6

#### 4.2.5. Vliv imobilizace

Při použití imobilizovaného systému  $\beta$ -galaktosidasy z *Bacillus* sp. zjistil Rugh<sup>54</sup> významný pokles maximální koncentrace trisacharidů a tetrasacharidů ve srovnání s volným enzymem. Betschart a Prenosil<sup>55</sup> a Mahoney<sup>38</sup> obdrželi podobné výsledky při použití *Aspergillus niger* (maximum koncentrace trisacharidů kleslo na 14 %, resp. 23 % a tetrasacharidů na 28 %, resp. 33 % z obsahu získaného účinkem neimobilizovaného enzymu). Foda a López-Leiva<sup>51</sup> dospěli v membránovém reaktoru k poklesu z 5,1 % na 4,5 % oligosacharidů.

### 5. Využití nestravitelných oligosacharidů v mlékárenské technologii

Nestravitelné oligosacharidy (nejvíce fruktooligosacharidy) se využívají jako aditiva do různých mléčných výrobků (kysaných mlék, jogurtů, sušených produktů, zmrzlin)<sup>12,15</sup>. Toba a spol.<sup>56</sup> sledovali změny v obsahu oligosacharidů v průběhu fermentace a skladování jogurtu zakysaného jogurtovou kulturou za současného působení  $\beta$ -galaktosidasy z *Aspergillus oryzae*. Obsah laktosy klesl o 64 %, u kontrolního jogurtu klesl o 35 % (bez účinku  $\beta$ -galaktosidasy), po 2 hodinách kultivace obsahoval jogurt 15 % galaktooligosacharidů, po 8 hodinách 12 % a po 10 dnech skladování při 5 °C obsahoval stále ještě 7 % galaktooligosacharidů. I kontrolní jogurt obsahoval galaktooligosacharidy díky transglykosylační aktivitě  $\beta$ -galaktosidas bakterií jogurtové kultury, nicméně 4–19× menší množství (0,3–1,7 %). Holubová a spol. aplikovali při výrobě jogurtu zároveň s fermentací  $\beta$ -galaktosidasu z *Aspergillus oryzae* a z *Kluyveromyces lactis* a sledovali změny v obsahu sacharidů v průběhu fermentace. Kromě toho zkoušeli také nejprve provést hydrolyzu laktosy v mléce z 80 % a pak teprve zahájit fermentaci. Ve všech těchto případech byl obsah galaktooligosacharidů v produktu již nevýznamný<sup>57</sup>. V České republice se mnoho zpracovatelů mléka (především výrobců sýrů a tvarohu) v posledních letech zajímá o možnosti zatím ekonomicky problematického využití syrovátky. Výroba preparátů s GOS je příležitostí pro zpracovatele syrovátky a možnosti pro využití laktosy do receptur nových výrobků. Výhodná je možnost spojení fyzikálně-chemických vlastností oligosacharidů s jejich funkcí růstového faktoru a prebiotickými vlastnostmi. Výzkumná činnost se zaměřuje na zavedení kysaného mléčného výrobku s obsahem probiotických kultur a galaktooligosacharidů na trh. Výroba preparátů s GOS je příležitostí pro zpracovatele syrovátky a možnosti pro vývoj nových výrobků.

*Tato práce vznikla s podporou výzkumného záměru MŠMT (CEZ:J19/98:223300005) a grantu MZe (QD 0281).*

### LITERATURA

1. Fernandes C. F., Shahani K. M., Amer M. A.: *Microbiol. Rev.* 46, 343 (1987).
2. Rivero-Urgell M., Santamaria-Orleans A.: *Early Hum. Dev.* 65, S43 (2001).
3. Sanders M. E.: *Int. Dairy J.* 8, 341 (1998).
4. Ziemer Ch. J., Gibson G. R.: *Int. Dairy J.* 8, 473 (1998).
5. Mattila-Sandholm T., Blum S., Collins J. K., Crittenden R., de Vos W., Dunne C., Fondén R., Grenov G., Isolauri E., Kiely B., Marteau P., Morelli L., Ouwehand A., Reniero R., Saarela M., Salminen S., Saxelin M., Schiffrin E., Shanahan F., Vaughan E., von Wright A.: *Trends Food Sci. Technol.* 10, 393 (1999).
6. Lourens-Hattingh A., Viljoen B. C.: *Food Res. Int.* 34, 791 (2001).
7. Gomes A. M. P., Malcata F. X.: *Trends Food Sci. Technol.* 10, 139 (1999).
8. Mattila-Sandholm T., Myllyerinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M.: *Int. Dairy J.* 12, 173 (2002).
9. Janer C., Peláez C., Requena T.: *Food Chem.* 86, 263 (2004).
10. Gopal P. K., Sullivan P. A., Smart J. B.: *Int. Dairy J.* 11, 19 (2001).
11. Scalabrini P., Rossi M., Spettoli P., Matteuzzi D.: *Int. J. Food Microbiol.* 39, 213 (1998).
12. Lourens-Hattingh A., Viljoen B. C.: *Int. Dairy J.* 11, 1 (2001).
13. Modler H. W.: *Int. Dairy J.* 4, 383 (1994).
14. Zubillaga M., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R., Boccio J.: *Nutr. Res.* 21, 569 (2001).
15. Voragen A. G. J.: *Trends Food Sci. Technol.* 9, 328 (1998).
16. Palframan R. J., Gibson G. R., Rastall R. A.: *Anaerobe* 8, 287 (2002).
17. Crittenden R. G., Playne M. J.: *Trends Food Sci. Technol.* 7, 353 (1996).
18. Englyst H. N., Hudson G. J.: *Food Chem.* 57, 15 (1996).
19. Rustom I. Y., Foda M. I., López-Leiva M. H.: *Food Chem.* 62, 141 (1998).
20. Schaafsma G., v knize: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F., ed.), str. 1529. Academic Press, London 2003.
21. Harju M.: *Int. J. Dairy Technol.* 54, 61 (2001).
22. Playne M. J., Crittenden R.: *Bull. International Dairy Federation* 313, 22 (1996).
23. Mitsuoka T.: *Nutr. Rev.* 50, 438 (1992).
24. Alander M., Maetto J., Kneifel W., Johansson M., Koegler B., Crittenden R., Mattila-Sandholm T., Saarela M.: *Int. Dairy J.* 11, 817 (2001).
25. Morishita Y., Oowada T., Ozaki A., Mizutani T.: *Nutr. Res. (N. Y.)* 22, 1333 (2002).
26. Iwasaki K., Nakajima M., Nakao S.: *Process Biochem.* 31, 69 (1996).

27. Jelen P., Tossavainen O.: *Austr. J. Dairy Technol.* 58, 161 (2003).
28. Alm L., v knize: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F., ed.), str. 1533. Academic Press, London 2003.
29. Holsinger V. H.: *Food Technol.* 3, 34 (1978).
30. Manan D. M. A., Karim A. A., Kit W. K.: *Food Chem.* 65, 439 (1999).
31. Fox P. F., Stepaniak L.: *Int. Dairy J.* 3, 509 (1993).
32. Gambelli L., Manzi P., Panfili G., Vivanti V., Pizzoferrato L.: *Food Chem.* 66, 353 (1999).
33. Knorr D.: *Trends Food Sci. Technol.* 9, 295 (1998).
34. Mahoney R.R., v knize *Developments in Dairy Chemistry* (Fox P. F. ed.), str. 69. Elsevier, London 1985.
35. Battelle Research Center Geneva: *Food Eng.* 3, 116 (1978).
36. Yanahira S., Kobayashi T., Suguri T., Nakakoshi M., Miura S., Ishikawa H., Nakajima I.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1021 (1995).
37. Richmond M. L., Gray J. I., Stine C. M.: *J. Dairy Sci.* 64, 1759 (1981).
38. Mahoney R. R.: *Food Chem.* 63, 147 (1998).
39. Garman J., Coolbear T., Smart J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 22 (1996).
40. Ekhardt P. F., Timmermans E.: *Bull. International Dairy Federation* 313, 59 (1996).
41. Jeon I. J., Mantha V. R.: *J. Dairy Sci.* 68, 581 (1985).
42. Boon M. A., Janssen A. E. M., van't Riet K.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 26, 271 (2000).
43. Greenberg N. A., Wilder T., Mahoney R. R.: *J. Dairy Res.* 52, 439 (1985).
44. Prenosil J. E., Stuker E., Bourne J. R.: *Biotechnol. Bioeng.* 30, 1026 (1987).
45. Prenosil J. E., Stuker E., Bourne J. R.: *Biotechnol. Bioeng.* 30, 1019 (1987).
46. Cruz R., Cruz V. D'A., Belote J. G., Khenayfes M. O., Dorta C., Oliviera L. H. S., Ardiles E., Galli A.: *Biores. Technol.* 70, 165 (1999).
47. Kim S. H., Lim K. P., Kim H. S.: *J. Dairy Sci.* 80, 2264 (1997).
48. Joergensen F., Hansen O. C., Stougaard P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 647 (2001).
49. Burvall A., Asp N. G., Dahlqvist A.: *Food Chem.* 4, 243 (1979).
50. Reuter S., Nygaard A. R., Zimmermann W.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 25, 509 (1999).
51. Foda M. I., López-Leiva M. H.: *Process Biochem.* 35, 581 (2000).
52. Bonnin E., Thibault J. F.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 19, 99 (1996).
53. Chen Ch. S., Hsu Ch. K., Chiang B. H.: *Process Biochem.* 38, 801 (2002).
54. Rugh S.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1, 27 (1982).
55. Betschart H. F., Prenosil J. E.: *J. Chromatogr.* 299, 498 (1984).
56. Toba T., Arihara K., Adachi S.: *J. Dairy Sci.* 69, 1241 (1986).
57. Holubová J., Rudolfová J., Čurda L.: *Mliekarstvo* 34, 51 (2003).

**J. Rudolfová and L. Čurda** (*Department of Dairy and Fat Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Galactooligosaccharides as Prebiotics and Their Production from Lactose**

In recent years an increasing interest in functional foods has been observed. Prebiotic oligosaccharides are one of the recognized ingredients. This group of compounds includes, e.g., fructooligosaccharides, inulin, isomaltooligosaccharides, lactose derivatives such as lactitol, lactulose, lactobionic acid or galactooligosaccharides. Prebiotic oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and lactobacilli in the intestine, which are considered to be beneficial to human health. Galactooligosaccharides are produced in the lactose hydrolysis using lactase ( $\beta$ -galactosidase, EC 3.2.1.23) preparations since lactase shows also transferase activity. Lactose accounts for over 70 % of the solid content in the milk whey obtained in cheese production. Production of galactooligosaccharides from lactose could be a method of whey utilization. Due to a rapidly increasing production and use, the conditions for achieving their maximal yields have been tested (lactose concentration and source, pH, temperature, enzyme concentration and source, enzyme immobilization). Galactooligosaccharides are used in beverages, powdered milk for infants, confectionery, bakery products, yoghurts and dairy desserts.

VŠCHT Praha vlastní novou telefonní ústřednu, její provolba je

**220 44**

Čtyřmístná čísla vnitřních linek zůstávají beze změny.