



## Polifruktany i fruktooligosacharydy (FOS) – występowanie, otrzymywanie i zastosowanie

Celina Kubik, Katarzyna Piasecka, Aneta Anyszka,  
Stanisław Bielecki

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

### Polyfructans and fructooligosaccharides (FOS) – occurrence, production and application

#### Summary

Information on beneficial impact of probiotic microorganisms on human health and effects of prebiotic oligosaccharides on proliferation of the latter microflora are presented in the first part of the article. Its further part focuses on fructans, i.e. structures of natural polyfructans and fructooligosaccharides, mechanisms of function of enzymes involved in their synthesis and methods of manufacturing of prebiotic fructooligosaccharides (FOS) in commercial scale.

#### Key words:

fructans, fructooligosaccharides(FOS), fructosyltransferase.

### 1. Wstęp

W ciągu ostatnich trzydziestu lat obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania wpływem mikroflory jelitowej na zdrowie człowieka. Mikroflora zasiedlająca jelito grube w ilości do  $10^{11}$  jtk  $\text{g}^{-1}$  treści jelitowej, zawiera zarówno szczepy korzystne, jak i patogenne dla gospodarza. Równowaga tego ekosystemu jest dynamiczna i może zmieniać się z wiekiem, przyjmowaniem leków, stresem, dietą oraz czynnikami środowiskowymi. W przewodzie pokarmowym zdrowego człowieka dominują bakterie z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, określane mianem bakterii probiotycznych (1-3). Niektóre korzystne działania tych

#### Adres do korespondencji

Celina Kubik,  
Instytut Biochemii  
Technicznej,  
Politechnika Łódzka,  
ul. Stefanowskiego 4/10,  
90-924 Łódź;  
e-mail:  
celkubik@snack.p.lodz.pl

---

#### biotechnologia

bakterii na zdrowie ludzi i zwierząt zostały w pełni udokumentowane w badaniach *in vivo*, inne są przewidywane na podstawie badań *in vitro*. Niezwykle istotną cechą bakterii probiotycznych jest antagonizm w stosunku do mikroorganizmów patogennych i gnilnych. Ma to związek z wytwarzaniem kwasu mlekowego, octowego,  $H_2O_2$  oraz syntezą bakteriocyn, które hamują lub ograniczają wzrost wielu patogenów jelitowych (głównie z rodzajów *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*). Inne potwierdzone lub przewidywane korzyści wynikające z aktywności bakterii probiotycznych obejmują m.in. znoszenie efektu nietolerancji laktozy, działanie antycholesterolowe, aktywność antynowotworową, działanie immunomodulatoryjne, działanie przeciwalergiczne, zapobieganie próchnicy, zapobieganie osteoporozie (4).

Jedną z metod zwiększania ilości korzystnych bakterii wśród mikroflory jelitowej jest dostarczanie organizmowi preparatów zawierających aktywne lub zliofilizowane komórki wyselekcjonowanych szczepów o właściwościach probiotycznych. Można je podawać metodą doustną w postaci preparatów farmaceutycznych lub też w fermentowanych produktach mlecznych otrzymany z ich udziałem (5-8).

Inną metodą uzyskania wzrostu populacji bakterii probiotycznych w jelitach jest uzupełnianie diety w tzw. prebiotyki (9), będące źródłem węgla i energii dla przyjaznych szczepów już bytujących w okrężnicy. Są one definiowane jako nie trawione składniki żywności, selektywnie pobudzające wzrost i/lub aktywność jednego lub określonej liczby rodzajów bakterii w okrężnicy, korzystnie wpływających na zdrowie gospodarza. Ze względu na selektywną stymulację rozwoju bifidobakterii prebiotyki nazywane są też czynnikami bifidogennymi.

Opisane dotychczas i wytwarzane na skalę przemysłową prebiotyki są sacharydami. Należą do nich: niskocukrowe alkohole, szereg nie trawionych oligosacharydów (NDOs) o zróżnicowanej strukturze chemicznej oraz niektóre polisacharydy. Na skalę przemysłową są wytwarzane w procesach enzymatycznych z wykorzystaniem albo enzymów hydrolitycznych albo transglikozylaz. Z udziałem hydrolaz prowadzone są dwa typy reakcji: 1) rozkład polisacharydów do odpowiednich oligocukrów, 2) synteza nowych oligosacharydów, gdy niskocząsteczkowe substraty cukrowe występują w wysokim stężeniu. Wydajność syntez jest wyższa w reakcjach prowadzonych z udziałem transferaz. Wyjątek stanowią oligocukry sojowe, które są bezpośrednio ekstrahowane z ziarna soi. Do prebiotycznych polisacharydów zaliczana jest inulina oraz różne rodzaje skrobi odporne na działanie enzymów trawiennych.

Prebiotyczne sacharydy są fermentowane w okrężnicy do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAc), z przewagą octowego i mlekowego (10), które są absorbowane przez nabłonek jelita i metabolizowane. Selektynemu rozwojowi bakterii probiotycznych w tym odcinku przewodu pokarmowego sprzyja nie tylko zdolność wykorzystywania przez nie różnych substratów cukrowych, ale również niewrażliwość na kwaśne środowisko, nie tolerowane przez wiele patogenów. W badaniach prowadzonych przez Gibsona i in. (11) wykazano, że podawanie fruktooligosacharydów (FOS) wolontariuszom w ilości 15 g dziennie w ciągu 15 dni znacznie

zwiększyło zawartość bifidobakterii w kale, przy jednoczesnym spadku ilości *Bacteroides*, *Fusobacterium* i *Clostridium*. Liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz pałeczek *Escherichia coli* pozostała na tym samym poziomie. Według Rao (12) już 5 g FOS w dziennej diecie prowadziło do wzrostu liczby bifidobakterii w jelitach. W przypadku uzupełniania diety galaktooligosacharydami (TOS) (13) w dawce 10 g dziennie w ciągu 21 dni, wzrastała ilość zarówno bifidobakterii, jak i bakterii kwasu mlekowego, przy spadku zawartości lub utrzymywaniu się na niezmiennym poziomie ilości innych bakterii. U ludzi, którym dostarczano 15 g rafinozy dziennie w ciągu 4 tygodni, obserwowano wzrost populacji bifidobakterii i równocześnie spadek bakterii z rodzajów *Clostridium* i *Bacteroides* (14).

Udowodniono następujące korzystne działanie prebiotyków na zdrowie człowieka:

- u noworodków nie karmionych mlekiem matki dodawanie prebiotycznych sacharydów do produktów mlecznych znacznie przyspiesza zasiedlanie bifidobakterii w przewodzie pokarmowym (15);

- w przypadkach infekcji przewodu pokarmowego prebiotyki przyspieszają re-stabilizację mikroflory jelitowej. Dzięki obniżeniu jelitowego pH w wyniku fermentacji prebiotyków, zasiedlanie patogenów, preferujących obojętne pH, jest ograniczone; istotna rola przypada również bakteriocynom wytwarzanym przez odbudowaną korzystną mikroflorę;

- zmniejszanie ryzyka powstawania raka jelita. Z ograniczeniem ilości niekorzystnych bakterii w okrężnicy ograniczana jest tym samym ilość produktów ich metabolizmu, działających genotoksycznie (16). Zostało wykazane, że podawanie prebiotyków prowadzi do obniżenia poziom fenolu, krezolu, indolu i skatolu w kale (17);

- obniżanie stężenia lipidów we krwi (18,19). Możliwy mechanizm obniżania cholesterolu we krwi wiąże się ze strącaniem kwasów żółciowych w jelitach, następującym w wyniku zakwaszenia środowiska przez SCFAC i ich usuwanie z kałem. Kwasy żółciowe nie zresorbowane z jelita do ponownego wykorzystania muszą być wytwarzane w wątrobie z cholesterolu zawartego we krwi;

- wzrost przyswajalności wielu pierwiastków, jak Ca, Fe, Mn, Zn, Cu, związany ze wzrostem ich rozpuszczalności w środowisku o obniżonym pH (20).

Do artykułów żywnościowych wzbogacanych w prebiotyki należą głównie napoje mleczne, w tym jogurty, lody, napoje odświeżające, niskokaloryczne słodyczne, desery, chleb, przetwory owocowe (21).

Badania nad funkcjonalnymi właściwościami oligosacharydów, ich wytwarzaniem i zastosowaniem zostały zapoczątkowane w Japonii w latach siedemdziesiątych XX w. (22). Wśród oligosacharydów o dobrze udokumentowanym działaniu prebiotycznym znajdują się fruktooligosacharydy (FOS), charakteryzujące się niższą niż sacharoza kalorycznością oraz słodkością. Szacuje się, że wartość kaloryczna inuliny i FOS wynosi tylko 1-1,5 kcal·g<sup>-1</sup>, w porównaniu do 4 kcal·g<sup>-1</sup> dla sacharozy, a słodczy, podobna w odczuciu do sacharozy, stanowi 32, 22 i 16% odpowiednio dla 1-kestozy, nystozy i 1<sup>F</sup>-fruktofuranozylozy (23).

W artykule zostaną scharakteryzowane fruktany występujące w naturze i enzymy biorące udział w ich syntezie, jak również zostaną omówione metody otrzymywania fruktooligosacharydów w celach komercyjnych.

## 2. Fruktany występujące w naturze

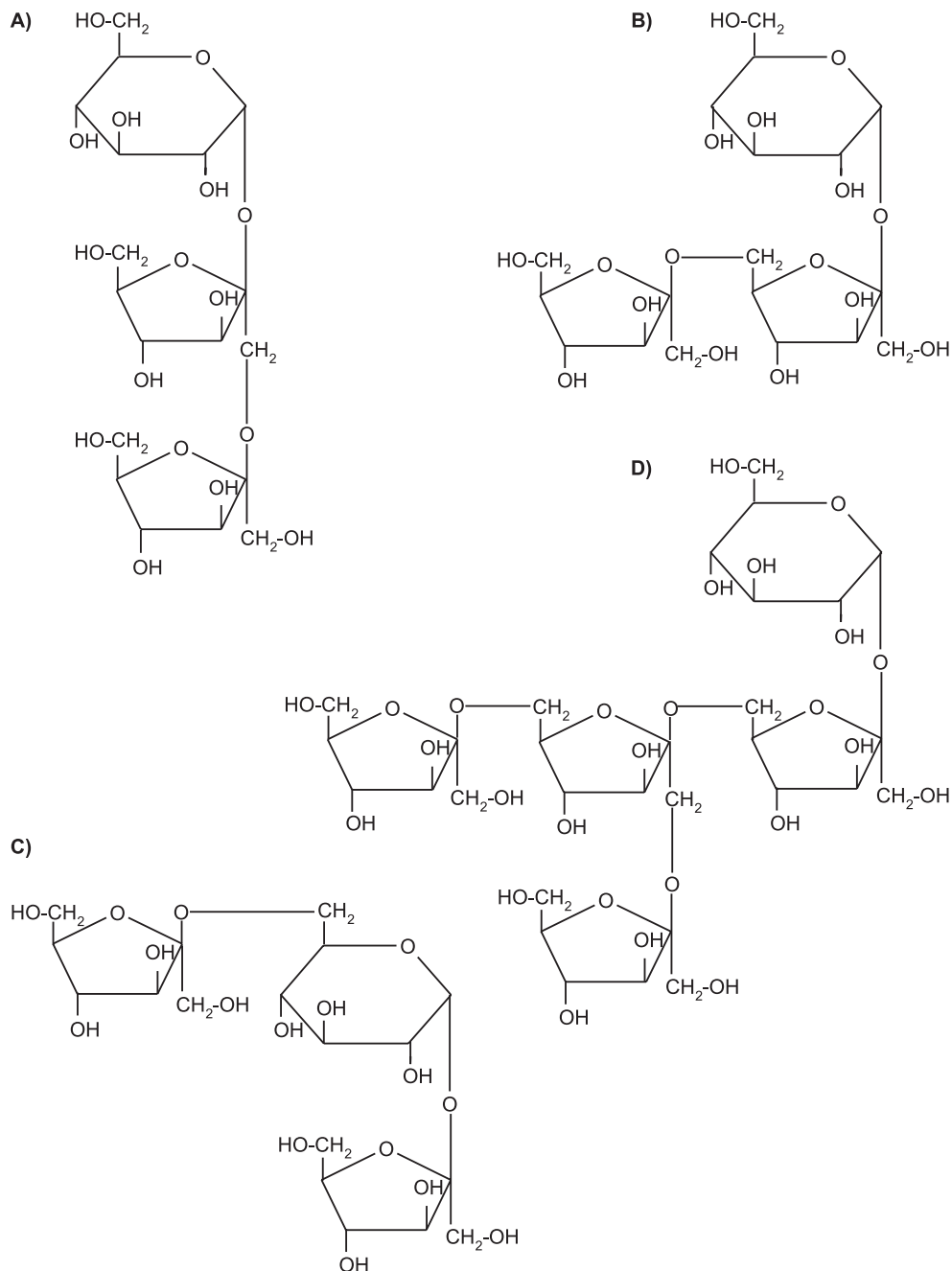
Fruktany, podobnie jak skrobia i sacharoza, występują w naturze jako zapasowe cukry roślinne oraz są wytwarzane przez niektóre drobnoustroje. Dla naturalnych fruktanów charakterystyczna jest obecność sacharozy na końcu łańcucha, do której przyłączone są reszty fruktozy. Ze względu na rodzaj wiązania glikozydowego łączącego jednostki fruktozylowe, związki te można podzielić na kilka podstawowych grup: fruktany serii 1-kestozy ( $1^F$ - $\beta$ -fruktofuranosacharydy), w których reszty fruktozy są połączone wiązaniami  $\beta$ -(2,1)-glikozydowymi; serii 6-kestozy ( $6^F$ - $\beta$ -fruktofuranosacharydy), w których głównym wiązaniem jest  $\beta$ -(2,6); fruktany o wiązaniach mieszanych:  $\beta$ -(2,1)- i  $\beta$ -(2,6)-, (6,6- i 1-kestopentaoza) oraz serii neokestozy ( $6^G$ - $\beta$ -fruktofuranosacharydy), w której reszta fruktozy jest dołączona do węgla 6 glukozy w cząsteczce sacharozy. Najkrótsze fruktany poszczególnych typów przedstawiono na rysunku 1.

Praktycznie termin fruktooligosacharydy (FOS) jest używany dla krótkołańcuchowych fruktanów zawierających 2-4 jednostki fruktozylowe połączone wiązaniami  $\beta$ -(2,1)-glikozydowymi (rys. 1A).

### 2.1. Fruktany roślinne

W roślinach fruktany występują głównie w formie długich łańcuchów inuliny lub krótkołańcuchowych fruktooligosacharydów (FOS) (seria 1-kestozy, rys. 1A). Stopień polimeryzacji inuliny przeciętnie waha się od 10 do 60. Inulina może ulegać degradacji pod działaniem rodzimych enzymów, stąd niektóre z roślin, w tym szczególnie karczochy, zawierają dużo krótkołańcuchowych FOS (24,25). Do roślin uprawnych gromadzących znaczące ilości fruktanów należą: cykoria, topinambur, karczochy, banany, czosnek, jęczmień, pszenica, cebula, liście buraka, pomidory, ryż, a z kwiatowych – kłącza dalii (26-29). W trawach występują fruktany o wiązaniach mieszanych, typu  $\beta$ -2,1 i  $\beta$ -2,6 (30,31) (rys. 1D).

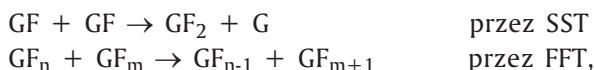
Ponieważ większość gatunków roślin wytwarzających fruktany rośnie w regionach nawiedzanych przez sezonowe susze lub chłody, prawdopodobnie obok roli materiału zapasowego pełnią one rolę ochronną jako osmo- lub krioprotektanty (32-35).



Rys. 1. Budowa fruktoooligosacharydów występujących w naturze: (A) – 1-kestoza, (B) – 6-kestoza, (C) – neokestoza, (D) – oligosacharyd o wiązaniach mieszanych.

### 2.1.1. Metabolizm fruktanów w roślinach

W syntezę roślinnych fruktanów zaangażowane są co najmniej dwa enzymy znajdujące się w wakuolach:  $1^F$ -SST (sacharoza:sacharoza  $1^F$ - $\beta$ -D-fruktozylotransferaza, EC 2.4.1.99) i  $1^F$ -FFT (1,2- $\beta$ -D-fruktan: 1,2- $\beta$ -D-fruktan  $1^F$ - $\beta$ -D-fruktozylotransferaza, EC 2.4.1.100) (22,36,37). SST katalizuje reakcję przeniesienia fruktozylowej grupy z donorowej cząsteczki sacharozy na akceptorową z wytworzeniem trisacharydu i glukozy. Drugi enzym, FFT, przekształca wytworzony przez SST trójcukier do wyższych fruktanów (38):



gdzie GF – sacharoza, natomiast n oraz m – ilość jednostek fruktozy w fruktanach.

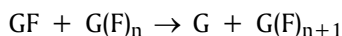
Akceptorami dla FFT mogą być fruktany, ale również sacharoza (39).

Oprócz wspomnianych  $1^F$ -fruktozylotransferaz, katalizujących przeniesienie reszt fruktozylowych do pierwszorzędowej hydroksylowej grupy końcowego fruktofuranozydu, w niektórych roślinach występują również  $6^G$ - i  $6^F$ -fruktozylotransferazy. W wyniku działania na sacharozę  $6^G$ -fruktozylotransferaz powstają oligosacharydy z glukozą wewnątrz łańcucha (rys. 1C). Rozgałęzione fruktany tworzone są przy równoczesnym działaniu  $1^F$ -,  $6^F$ - i  $6^G$ -fruktozylotransferaz (rys. 1D).

## 2.2. Fruktany bakteryjne

Niektóre szczepy bakteryjne, np. z rodzajów *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp. (40) oraz *Zymomonas* (41) i *Lactobacillus* sp. (42) wytwarzają liniowe fruktany z serii 6-kestozy (rys. 1B), o nazwie lewan, których masa cząsteczkowa może osiągać ponad  $2 \times 10^6$  Da (43).

Za syntezę zarówno trisacharydów, jak i wysokocząsteczkowych fruktanów jest odpowiedzialny jeden enzym, lewanosacharaza (LS, EC 2.4.1.10) (44,45), która katalizuje przenoszenie reszty fruktozy z sacharozy na rosnący łańcuch polimeru:



Wyniki badań nad zdolnościami prebiotycznymi lewanów nie są zgodne, na co prawdopodobnie ma wpływ różny materiał biologiczny użyty do doświadczeń. Jedni autorzy uważają, że bifidobakterie nie przyswajają ani wysokocząsteczkowego polimeru (46), ani oligomerów o masie cząsteczkowej około 6000 Da (d.p.~ 37) (47). Fermentowane są natomiast, w różnym stopniu przez różne szczepy, oligomery

o stopniu polimeryzacji poniżej 20 (8). Na podstawie takich wyników sugeruje się, że o wykorzystywaniu fruktanu przez bifidobakterie decyduje jego masa cząsteczkowa, a nie typ występującego wiązania.

Inne są wyniki badań Bello i in. (42), według których wysokomolekularny lewan wytwarzany przez *Lactobacillus sanfranciscensis*, dodany do hodowli drobnoustrojów fekalnych wykazywał działanie prebiotyczne. Interesujące jest, że znaczące ilości tego polisacharydu (do 5 g kg<sup>-1</sup> ciasta) mogą być wytwarzane podczas przygotowywania zakwasów chlebowych z mąki pszennej lub ryżowej, szczepionych *L. sanfranciscensis* (48). Również handlowy lewan z *Erwinia herbicola* charakteryzował się właściwościami prebiotycznymi (43).

Podobnie jak fruktany roślinne, lewany są uważane za osmo- i krioprotektanty. Gen bakteryjny odpowiedzialny za nagromadzanie lewanu został z powodzeniem wprowadzony do tytoniu i ziemniaka, w celu zmniejszenia wrażliwości roślin na susze i chłody (49).

### 2.3. Fruktooligosacharydy (FOS) wytwarzane przez grzyby nitkowate

Zdolność syntezy enzymów przetwarzających sacharozę do FOS wykazuje wiele szczepów z rodzajów *Aspergillus* i *Aureobasidium* (50). Nomenklatura tych enzymów jest ciągle dyskutowana. Jedni autorzy klasyfikują je do  $\beta$ -fruktofuranazydaz (FFazy, EC 3.2.1.26) (51-53), inni do inulosacharaz (EC 2.4.1.9), określanych powszechnie jako fruktozylotransferazy (FT-azy) (54-56). Przesłanki przemawiające za klasyfikacją do  $\beta$ -fruktofuranazydaz to wykazywanie przez niektóre enzymy wysokiej aktywności inwertazowej i niskiej transferazowej w roztworach o niskim stężeniu sacharozy, podczas gdy przy wysokich stężeniach substratu zależność jest odwrotna (52). Istnieją również trudności przy rozdzielaniu tych aktywności metodami chromatograficznymi (57-59). Tylko L'Hocine i in. (55) wydzielili z *Aspergillus niger* AS0023 fruktozylotransferazę katalizującą wyłącznie reakcję transferu i  $\beta$ -fruktofuranazydazę nie wykazującą tej aktywności. Wyniki uzyskane przez Hirayama i in. (52) nie były już tak jednoznaczne. Oczyszczony do homogenności enzym z *Aspergillus niger* ATTC 20611 w 50% roztworze sacharozy katalizował prawie wyłącznie transfer fruktozy, natomiast w 5% roztworze wykazywał i aktywność transferazową i inwertazową.

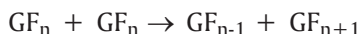
Według badań Hidaka i in. (59) mechanizm działania typowej  $\beta$ -fruktofuranazydazy drożdżowej jest inny niż pleśniowej. W produktach 24-godzinnej reakcji prowadzonej w 50% roztworze sacharozy z udziałem enzymu z *A. niger* ATCC 20611 znajdowało się: 50-60% FOS, 20-30% glukozy (ubocznego produktu reakcji), śladowe ilości fruktozy i 10-15% nie zużytej sacharozy. Produktami działania drożdżowej inwertazy w reakcji prowadzonej w tych samych warunkach była równoważna ilość glukozy i fruktozy.

$\beta$ -fruktofuranazydaza drożdżowa w roztworach sacharozy o wysokim stężeniu syntetyzuje FOS w reakcjach odwróconej hydrolizy, ale wydajność produktów wy-

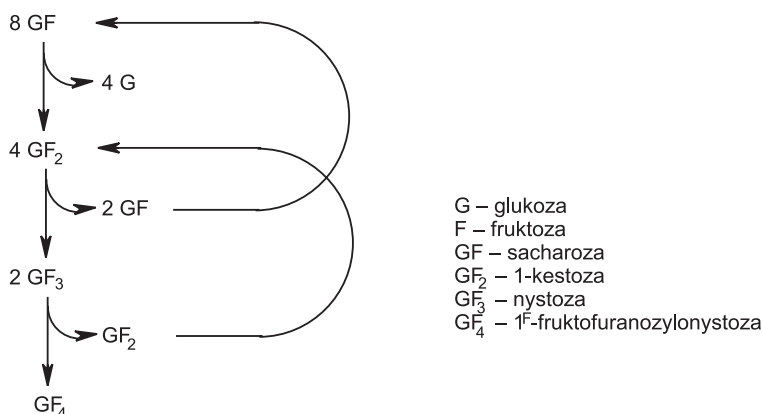
nosi tylko kilka procent (50,60). Bielecki i Somiari (60) niewielki dalszy wzrost wydajności uzyskali prowadząc reakcję w obecności rozpuszczalników organicznych.

### 2.3.1. Mechanizm syntezy FOS przez enzymy pochodzenia pleśniowego

Wyjaśnieniem mechanizmu wytwarzania FOS przez enzymy pochodzenia pleśniowego zajmowało się wielu badaczy (52,56,59,61-64). Zaproponowany przez Yung i in. (56) mechanizm działania fruktozylotransferazy z *Aureobasidium pullulans* polega na przenoszeniu reszt fruktozy w ciągu reakcji dysproporcjonowania, w których sacharoza lub wcześniej wytworzone FOS są donorami lub akceptorami reszt fruktozy:



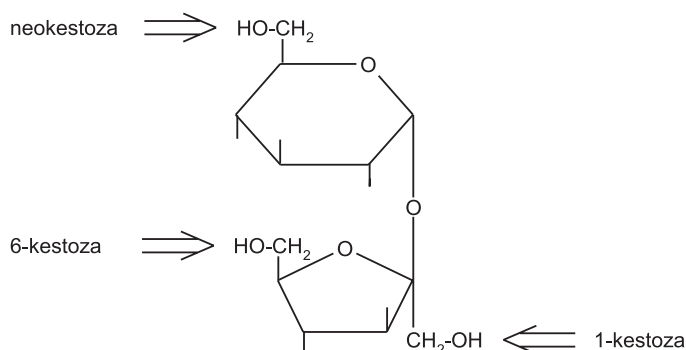
W konsekwencji kolejnych reakcji tworzą się: 1-kestoza, nystoza i 1<sup>F</sup>-fruktozylonystoza oraz uwalniana jest glukoza, która jest kompetycyjnym inhibitorem enzymu. Gdy Yung i in. (64) użyli 1-kestozę i nystozę jako substraty, następował gwałtowny spadek  $V_{max}$  i wzrost  $K_m$ . Dla wytworzenia homologu większego o jedną jednostkę fruktozy niezbędne było wysokie stężenie poprzedniego oligosacharydu. Na początku trwania reakcji enzymatycznej zawartość 1-kestozy była wysoka, a z jej wydłużaniem, przy prawie niezmienionej sumarycznej ilości FOS, wzrastało stężenie  $GF_3$  i  $GF_4$ , a spadało 1-kestozy. W podsumowaniu Yung i in. (64) zaproponowali następujący model działania pleśniowych enzymów wytwarzających FOS:



Rys. 2. Model syntezy FOS przez fruktozylotransferazy pleśniowe (Yung i in. (64)).



Podobnie jak enzymy roślinne, większość transferaz pleśniowych uczestniczących w reakcjach przemiany sacharozy do fruktooligosacharydów wykazuje wysoką regiospecyficzność przenosząc resztę fruktozy do grupy OH-1<sup>F</sup> końcowej fruktofuranozy z utworzeniem 1-kestozy i jej homologów. Niektóre fruktozylotransferazy przenoszą fruktozę do OH-6<sup>F</sup> i OH-6<sup>G</sup> z wytworzeniem odpowiednio 6-kestozy i neokestozy oraz ich homologów (59):



Rys. 3. Regiospecyficzność fruktozylotransferaz pochodzenia pleśniowego (Hidaka i in. (59)).

### 3. Otrzymywanie FOS na skalę przemysłową

Roczna światowa produkcja prebiotycznych FOS już w 1995 r. była szacowana na 12 000 ton (65). W skali przemysłowej są one otrzymywane dwiema metodami: 1) z roślinnego polisacharydu inuliny poddanej hydrolizie enzymatycznej oraz 2) z sacharozy z udziałem transferaz pochodzenia mikrobiologicznego.

W pierwszym przypadku inulina jest ekstrahowana z korzeni cykorii lub topinambura (66), w których jej zawartość osiąga nawet 20% suchej masy. Bogate w inulinę ekstrakty są poddawane działaniu endoinulinazy (2,1-β-D-fruktan fruktanohydrolaza; EC 3.2.1.7) (67,68), a produktami hydrolizy jest mieszanina łańcuchów o stopniu polimeryzacji do około 7 (15), zawierających wyłącznie fruktozę (F<sub>m</sub>) lub zakończonych glukozą (GF<sub>n</sub>). Ten typ FOS jest wytwarzany w celach handlowych w belgijskiej firmie Orafiti Ltd. jako Raftilose oraz w holenderskiej firmie Imperia-Suiker Unie jako Frutafit (69,70). Ze względu na niskie plony roślin w przeliczeniu na powierzchnię upraw, wydajność otrzymywania FOS z inuliny jest stosunkowo niska.

Druga metoda otrzymywania fruktooligosacharydów w skali przemysłowej, tj. synteza enzymatyczna z sacharozy z udziałem enzymów pochodzenia mikrobiologicznego, jest bardziej ekonomiczna w porównaniu z opisaną. Producentami enzymów są głównie pleśnie z rodzajów *Aureobasidium* i *Aspergillus*: *Aureobasidium pullulans* (56),

*A. niger* (59), *A. japonicus* (51,71), *A. oryzae* (53,61), *A. foetidus* (54), *A. sydowi* (72), *A. phoenicis* (73), ale również *Fusarium oxysporum* (74) i *Penicillium* (75,76).

Fruktozylotransferazy (lub  $\beta$ -fruktofuranozydazy o wysokiej aktywności transferazowej) są otrzymywane w natlenianych hodowlach wgłębnych w podłożach zawierających sacharozę jako jedyne źródło węgla. W skład stosowanych podłoży produkcyjnych obok sacharozy wchodzi: ekstrakt drożdżowy,  $MgSO_4$  i  $NaNO_3$  (56,59,62, 71), a podłoże opracowane przez Hidaka i in. (59) dla szczepu *A. niger* ATCC 20611 zawiera również CM-celulozę.

Większość opisanych w literaturze szczepów w początkowej fazie hodowli gromadzi aktywność transferazową w grzybni (52,56,59,74). Z wydłużeniem czasu hodowli niektóre szczepy stopniowo uwalniają enzym do cieczy fermentacyjnej (22,71), w niektórych zaś pozostaje on ściśle związany z biomasą (52,56,59,74). W hodowlach szczepu *A. niger* ATCC 20611, wykorzystywanego w Japonii do przemysłowej produkcji FOS, aktywność w grzybni od pierwszej do trzeciej doby pozostawała na zbliżonym poziomie, przy stosunku aktywności transferazowej do inwertazowej (FT/I) wynoszącym 12-14 (59). Również fruktozylotransferaza stosowana w Korei do produkcji FOS, wytwarzana przez szczep *A. pullulans* w 36-godzinnych hodowlach w fermentorze, jest gromadzona w komórkach. Aktywność wewnątrzkomórkowego enzymu rośnie ze wzrostem stężenia jonów  $Mg^{2+}$  w podłożu (56). W celu otrzymania enzymu w stanie wolnym przeprowadzana jest liza komórek.

Autorzy tej pracy w czasie pierwszych trzech dób hodowli wgłębnych szczepów *A. niger* ŁOCK 0431 i *A. oryzae* ŁOCK 0445 również obserwowali gromadzenie się aktywności transferazowej w grzybni, podczas gdy znaczna część aktywności inwertazowej była uwalniana do podłoża. Stosunek FT/I w biomacie utrzymywał się na poziomie kilkanaście i powyżej, natomiast w cieczy nie przekraczał 5. Wydłużenie hodowli do pięciu dób prowadziło do uwolnienia do cieczy fermentacyjnej około 50% aktywności transferazowej. W hodowlach wgłębnych innego szczepu, *A. niger* ŁOCK 0430, aktywność transferazowa albo pozostawała ściśle związana z grzybnią, albo była uwalniana do cieczy, w zależności od sposobu przygotowania inokulumu.

Optymalne parametry działania FT pleśniowych wahają się w dość szerokich granicach: stężenie sacharozy 50-85% w/v (51,52,55,59,77), temperatura 40-65°C (22,50) i pH na ogół 5-6 (22,50,53,73), ale również 8 i powyżej (50). W procesach ciągłych, dla zachowania stabilności enzymów, utrzymywane są temperatury niższe od optymalnych (78).

Ze względów ekonomicznych, w przemysłowej produkcji FOS najczęściej są stosowane unieruchomione preparaty enzymów lub komórek, wykorzystywane w procesach okresowych lub ciągłych (62,63,77,79-83). W japońskiej firmie Meiji Seika Co. (pierwszy w świecie i czołowy producent FOS), produkcja jest prowadzona w systemie ciągłym z wykorzystaniem preparatów grzybni *A. niger* pułapkowanej w żelu alginianowym. FOS produkowane w Japonii od początku lat osiemdziesiąt XX w. (22) znajdują się na rynku pod nazwami Meioligo, Neosugar, Profeed, Actilight, lub Nutraflora (23,59,84). Drugim poważnym producentem FOS jest Korea. W firmie Cheil

Foods & Chemicals Co. w procesach ciągłych wykorzystywane są komórki *A. pullulans*, również pułapkowane w żelu alginianowym (63,85).

Zwiększenie produktywności FOS w porównaniu z opisanymi, dzięki mniejszym oporom przepływu, uzyskiwano w syntezach ciągłych prowadzonych z użyciem enzymu unieruchomionego na żywicach jonowymiennych (78). Wadą preparatów FT unieruchomionych na jonitach jest ich mniejsza stabilność operacyjna (20 dni ciągłej pracy bez strat aktywności), w porównaniu z komórkami pułapkowanymi w alginianie (60 i 100 dni pełnej aktywności) (80). Do unieruchamiania FT były wykorzystywane również gluten (86) i alkohol poliwinylowy (87,88), ale nośniki te nie znalazły zastosowania przemysłowego.

Prowadzone w zespole Yun i in. (89) próby zniesienia inhibicji glukozy przez równoczesne użycie fruktozylotransferazy i izomerazy glukozy, nie dały zadowalających wyników. Zwiększenie wydajności FOS uzyskano w reakcji prowadzonej w obecności oksydazy glukozy, przemieniającej glukozę do kwasu glukonowego (90). Tanriseven i Gokmen (91) otrzymali mieszaninę prebiotycznych FOS izomaltooligosacharydów (IMO<sub>s</sub>) prowadząc reakcję kolejno z fruktozylotransferazą, a następnie z dekstranosacharazą. Po pierwszym etapie procesu mieszanina reakcyjna zawierała FOS, glukozę i sacharozę, natomiast w drugim dekstranosacharaza przekształcała pozostałą sacharozę (donor jednostek fruktozylowych) i uwolnioną w poprzedniej reakcji glukozę (akceptor) do IMO<sub>s</sub>.

Ponieważ słodycz FOS spada z wydłużeniem długości łańcucha fruktozy (23,77), ze względów komercyjnych korzystnie byłoby tak ustalać warunki reakcji, aby otrzymywać mieszaninę cukrów o pożądanym składzie. W oparciu na matematycznym modelu zaproponowanym przez Yung i in. (64), istnieje taka możliwość.

Dostępne w handlu syropy FOS zawierają około 800 g $\square$ <sup>-1</sup> suchej masy. Prowadzenie syntez FOS w roztworach sacharozy o wysokim stężeniu (50-85%) pozwala otrzymywać syropy, które albo nie wymagają, albo wymagają niewielkiego zatężania. W ich skład wchodzi: 50-60% FOS, 25-30% glukozy, śladowe ilości fruktozy oraz 10-15% sacharozy.

#### 4. Podsumowanie

Fruktooligosacharydy (FOS) należą do środków słodzących nie sprzyjających próchnicy zębów, mniej słodkich niż sacharoza, a przede wszystkim – fermentowanych przez korzystne dla gospodarza bakterie jelitowe z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Produkty metabolizmu tych bakterii stwarzają środowisko niekorzystne dla rozwoju patogenów. FOS występują w wielu popularnych warzywach, m. in. w cebuli, czosnku, karczochach, ale ich ilość w pożywieniu na ogół nie zapewnia poziomu, który wyraźnie sprzyja poprawie zdrowia. W krajach Dalekiego Wschodu już od kilkunastu lat FOS są zaakceptowanymi dodatkami do żywności, a ich produkcja polega na przetwarzaniu sacharozy przez fruktozylotransferazy pochodzenia

mikrobiologicznego. Rynek zbytu tych cennych prebiotyków ciągle rozszerza się w Europie oraz USA.

W Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej są prowadzone badania nad opracowaniem rodzimej technologii wytwarzania FOS, z wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów *Aspergillus niger* wytwarzających fruktozylotransferazę.

## Literatura

1. Allen W. D., Linngod M. A., Porter P., (1992), European Patent Application EP 050870AZ, Dairy Sci. Abstr., 55, 1208.
2. Larsen A. G., Vogensen F. K., Josephsen J., (1993), J. Appl. Bacteriol., 75, 113-122.
3. Lee Y. K., Salminen S., (1995), Trends Food Sc. Technol., 6, 241-245.
4. Usajewicz I., (1998), *Bakterie fermentacji mlekowej*. Monografie, Wyd. Politechniki Łódzkiej, 123-137.
5. Bielecka M., Biedrzycka E., (1999), I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wrocław, w: *Bakterie fermentacji mlekowej*. Monografie, Wyd. Politechniki Łódzkiej, 150-158.
6. Dembczyński R., Jankowski T., (1999), Food Biotechnol., Zakopane, 68-69.
7. Kaplan H., Hutkins R. W., (2000), Appl. Environm. Microbiol., 66, 2682-2684.
8. Marx S. P., Winkler S., Hartmeier W., (2000), FEMS Microbiol. Lett., 182, 163-169.
9. Gibson G. R., Roberfroid M. B., (1995), J. Nutr., 125, 1401-1412.
10. Cummings J. H., Macfarlane G. T., (1997), Nutr., 13, 476-478.
11. Gibson G. R., Wang X. E. R., Cummings J. H., (1995), Gastroenterology, 108, 975-982.
12. Rao V. A., (2001), Nutr. Res., 21, 843-848.
13. Gibson G. R., Ito M., Deguchi Y., Miyamori A., (1990), Microb. Ecol. Health Dis., 3, 285-292.
14. Gibson G. R., Hayakawa K., Mitzutani J., Wad K., (1990), Microb. Ecol. Health Dis., 3, 293-303.
15. Playne M. J., Crittendon R., (1996), Bull. Int. Dairy Fed., 313, 10-22.
16. Rowland I., (1995), Univ. Semin. Monogr., 8, 35-46.
17. Ballongue J., Schuman C., Quignon P., (1977), Scand. J. Gastroenterol., 32, 222, 41-44.
18. Danielson A. D., Peo E. R., Shahani K. M., Lewis A. J., Whalen P. J., Amer M. A., (1989), J. Anim. Sci., 67, 966-974.
19. Walker D. K., Gilliland S. E., (1993), J. Dairy. Sci., 76, 956-961.
20. Hoover D. G., (1993), Food Tech. 67, 120-124.
21. Takunaga T., Oku T., Hosoya N., (1989), J. Nutr., 119, 553-559.
22. Yun J. W., (1996), Enzyme Microbiol. Technol., 19, 107-117.
23. Spiegel J. E., Rose R., Karabell P., Frankos V. H., Schmitt D. F., (1994), Food Technol., 1, 85-89.
24. Campbell J. M., Bauer L. L., Fahey G. C., Hogarth A. J. C. L., Wolf B. W., Hunter D. E., (1997), J. Agric. Food Chem., 45, 3076-3082.
25. Roberfroid M. B., van Loo J. A. E., Gibson G. R., (1998), J. Nutr., 128, 11-19.
26. Hendry G. A. F., Wallace R. K., (1993), *Science and technology of fructans*, (edited by Suzuki M., Chatterton N. J., Boca Raton F. L., CRP Press), 119-139.
27. Henry R. J., Darbyshire B., (1980), Phytochemistry 19, 1017-1020.
28. Shiomi N., Yamada J., Izawa M., (1979), Agric Biol. Chem., 43, 2233-2244.
29. Jaime L., Martinez F., Martin-Cabrejas M. A., Mollá E., López-Andréu F. J., Waldron K. W., Esteban R. M., (2000), J. Sci. Food Agric., 81, 177-182.
30. Bancal P., Carpita N. C., Gaudillère J. P., (1992), New Phytol., 120, 313-322.
31. Lewis D. H., (1993), New Phytologist, 124, 583-593.
32. Bielecki R. L., (1993), Plant Physiol., 103, 213-219.
33. Chatterton N. J., Harrison P. A., Bennett J. H., Asay K. H., (1989), J. Plant Physiol., 134, 169-179.
34. Hendry G. A. F., (1993), New Phytol., 123, 3-14.

35. Suzuki M., Chatterton N. J., (1993), *The Science and Technology of Fructans*, CRC Press, Boca Raton, FL, 232-233.
36. Lüschner M., Erdin C., Sprenger N., Hochstrasser U., Boller T., Wiemken A., (1996), *FEBS Lett.*, 385, 39-42.
37. van den Ende W., van Laere A., (1996), *Planta*, 200, 335-342.
38. Edelman J., Jefford T. G., (1968), *New Phytol.*, 67, 517-531.
39. <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
40. Rosell K. G., Birkhed D., (1974), *Acta Chem. Scand.*, 28, 589.
41. Bekers M., Linde R., Danilevich A., Kaminska E., Upite D., Vigants A., Scherbaca R., (1999), *Food Biotechnol.*, 13, 107-119.
42. Bello F. D., Walter J., Hertel C., Hammes W. P., (2001), *Syst. Appl. Microbiol.*, 24, 232-237.
43. Korakli M., Gänzle M. G., Vogel R. F., (2002), *J. Appl. Microbiol.*, 92, 958-965.
44. Carlsson J., (1970), *Caries Res.*, 4, 97.
45. Dedonder R., (1966), *Methods Enzymol.*, 8, 500-506.
46. Muramatsu K., Onodera S., Kikuchi M., Shimi N., (1994), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1642-1645.
47. Yamamoto Y., Takahashi Y., Kawano M., Iizuka M., Matsumoto T., Seaki S., Yamaguchi H., (1999), *J. Nutr. Biochem.*, 10, 13-18.
48. Korakli M., Rossman A., Gänzle M. G., Vogel R. F., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5194-5200.
49. Pilon-Smits E. A. H., Ebskamp M. J. M., Paul M. J., Jenken M. J. W., Weisbeek P. J., Smeekens S. C. M., (1995), *Plant. Physiol.*, 107, 125-130.
50. Antošová M., Polakovič M., (2001), *Chem. Pap.*, 55, 350-358.
51. Chen W., Liu C., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 153-160.
52. Hirayama M., Sumi N., Hidaka H., (1989), *Agric. Biol. Chem.*, 53, 667-673.
53. Kurakake M., Onoue T., Komaki T., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 236-239.
54. Hang Y. D., Woodams E. E., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 17, 295-298.
55. L'Hocine L., Wang Z., Jiang B., Xu S., (2000), *J. Biotechnol.*, 81, 73-74.
56. Yung K. H., Lim J. Y., Yoo J., Lee J. H., Young M., (1987), *Biotechnol. Lett.*, 9, 703-708.
57. Chang C. T., Lin Y. Y., Tang M. S., Lin C. F., (1994), *Biochem. Mol. Biol. Inst.*, 32, 269-277.
58. Chen J. S., Saxton J., Hemming F. W., Peberdy J. F., (1996), *Biochem. Biophys. Acta*, 1296, 207-218.
59. Hidaka H., Hirayama M., Sumi N., (1988), *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1181-1187.
60. Bielecki S., Somiari R. I., (1996), *Biocat. Biotrans. J.*, 13, 217-231.
61. Pazur J. H., (1952), *J. Biol. Chem.*, 199, 217-225.
62. Yun J. W., Song S. K., (1992), *Meth. Biotechnol.*, 10, 141-149.
63. Yun J. W., Yung K. H., Oh J. W., Lee J. H., (1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25, 299-308.
64. Yung K. H., Yun J. W., Kang K. R., Lim J. Y., Lee J. H., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 491-494.
65. Crittenden R. G., Playne M. J., (1996), *Trends Food Science Technol.*, 7, 353-361.
66. Coussement P., (1999), *J. Nutr.*, 129, 1412S.
67. Kim D. H., Choi Y. J., Song S. K., Yun J. W., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 369-371.
68. Yun J. W., Kim D. H., Kim B. W., Song S. K., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 553-556.
69. Andersson H. B., Ellegard L. H., Bosaeus I. G., (1999), *J. Nutr.*, 129, 1428S.
70. Roberfroid M. B., (1999), *J. Nutr.*, 129, 1436-1437.
71. Su Y.-C., Sheu C.-S., (1993), *Proc. Nat. Sci. Coun., ROC, Part B: Life Sci.*, 17, 62-69.
72. Muramatsu M., Nakakuki T., (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 208-212.
73. van Balken J. A. M., van Dooren J. G. M., van del Tweel W. J. J., Kamphuis J., Meijer E. M., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 216-221.
74. Patel V., Saunders G., Bucke C., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 1139-1144.
75. Barthomeuf C., Pourrat H., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 17, 911.
76. Park M. C., Lim J. S., Kim J. C., Park S. W., Kim S. W., (2005), *Biotechnol. Lett.*, 27, 127-130.
77. Cruz R., Cruz D., Belini M. Z., Belote J. G., Vieira C. R., (1998), *Bioresour. Technol.*, 65, 139-143.
78. Yun J. W., Kang S. C., Song S. K., (1995), *Biotechnology Techniques*, 9, 805-808.
79. Cheng C. Y., Duan K. J., Sheu D. C., Lin C. T., Li S. Y., (1996), *J. Chem. Biotechnol.*, 66, 135-138.
80. Hayashi S., Tubouchi M., Takasaki Y., Imada K., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 227-228.

81. Patil V. B., Patil N. B., (1999), *Ind. J. Experiment. Biol.*, 37, 830-834.
82. Tanriseven A., Aslan Y., (2005), *Enz. Microb. Techn.*, 36, 550-554.
83. Patil V. B., Patil N. B., (1999), *Indian J. Exp. Biol.*, 37, 830-834.
84. Oku T., Tokunaga T., Hosoya N., (1984), *J. Nutr.*, 114, 1574-1581.
85. Yun J. W., Jung K. H., Jeon Y. J., Lee J. H., (1992), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 98-101.
86. Chien C. S., Lee W. C., Lin T. J., (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 29, 252-257.
87. Chen K. C., Lin Y. F., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 79-83.
88. Lusta K. A., Chung I. K., Sul I. W., Park H. S., Shin D. I., (2000), *Proc. Biochem.*, 35, 1177-1182.
89. Yun J. W., Noh J. S., Lee M. G., Song S. K., (1993), *J. Korean Inst. Chem. Eng.*, 31, 846-851.
90. Yun J. W., Song S. K., (1993), *Biotechnol. Lett.*, 15, 573-576.
91. Tanriseven A., Gokmen F., (1999), *Biotechnol. Techniques*, 13, 207-210.