



## $\beta$ -D-galaktozydazy – źródła, właściwości i zastosowanie

Marta Wanarska, Józef Kur

Katedra Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

### $\beta$ -D-galactosidases – sources, properties and applications

#### Summary

The rapid development of the world industry requires the introduction of new technologies which are more effective and cheaper. Therefore, the application of enzymes in different industry sectors grows steadily. This article reviews some properties and applications of  $\beta$ -D-galactosidases derived from microbial sources.

#### Key words:

$\beta$ -D-galactosidase, lactose hydrolysis, transglycosylation.

### 1. Wstęp

Rozwój światowego przemysłu uzależniony jest od wprowadzania coraz nowszych technologii, które umożliwiają wydajną i taną produkcję wysokiej jakości dóbr konsumpcyjnych. Tradycyjne technologie stosowane w przemyśle często nie spełniają tych wymogów, wymagają dużych nakładów energii, charakteryzują się zużyciem dużej ilości substratów i wytworzeniem znacznej ilości odpadów poprodukcyjnych. Z tych względów coraz częściej stosowane są procesy technologiczne, w których rolę katalizatorów reakcji chemicznych pełnią enzymy. Główną właściwością enzymów jest ich aktywność katalityczna i specyficzność działania. Reakcje katalizowane enzymatycznie przebiegają z dużą szybkością w łagodnych warunkach i pozwalają na uzyskanie pożądanego produktu z dużą wydajnością. Stosowanie

#### Adres do korespondencji

Marta Wanarska,  
Katedra Mikrobiologii,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska,  
ul. Narutowicza 11/12,  
80-952 Gdańsk.

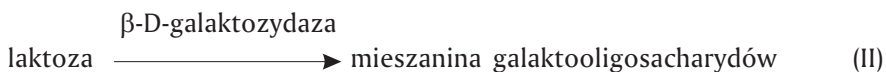
enzymów umożliwia też uzyskanie jednego produktu będącego określonym izomerem przestrzennym (stereoizomerem). Chociaż aktywność katalityczna enzymów od wieków była wykorzystywana przez człowieka, dopiero rozwój nowoczesnej biotechnologii pozwolił na szerokie zastosowanie tych biokatalizatorów w procesach przemysłowych. Na największą skalę produkowane są i wykorzystywane enzymy hydrolityczne: proteazy, lipazy i hydrolazy glikozydowe. Jako składniki proszków do prania stosowane są na co dzień w każdym gospodarstwie domowym (1). Enzymy znajdują też coraz większe zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym. Lipazy, acylazy i glikozylotransferazy wykorzystywane są w regio- i stereoselektywnej syntezie leków (2,3). Natomiast przemysł chemiczny stosuje katalizę enzymatyczną w produkcji akrylamidu, 1,3-propanodiolu, a także związków chemicznych wykazujących czynność optyczną (3).

Obecnie większość enzymów stosowanych w procesach przemysłowych pochodzi z mikroorganizmów mezofilnych, jednak wzrastające zapotrzebowanie na biokatalizatory sprawia, że ciągle poszukiwane są nowe źródła enzymów o specyficznych właściwościach. Przykładowo, enzymy będące składnikami proszków do prania (proteazy, lipazy, amylazy i celulazy) muszą być aktywne i stabilne w wysokim pH. W ostatnich latach wzrosło też zainteresowanie enzymami wykazującymi wysoką aktywność w niskich temperaturach. Zastosowanie tych biokatalizatorów w środkach piorących pozwoliłoby na zmniejszenie zużycia energii elektrycznej (1). Natomiast  $\alpha$ -amylazy wykorzystywane w przetwórstwie skrobi muszą wykazywać aktywność i stabilność w wysokiej temperaturze. Pierwszy etap przemysłowego procesu wytwarzania syropów skrobiowych, prowadzony jest w temperaturze 80-90°C, która zapewnia odpowiednią rozpuszczalność substratu, zapobiega zanieczyszczeniom mikrobiologicznym bioreaktora i powoduje strącanie pozostałości białek zanieczyszczających skrobię (1,4). W przypadku  $\beta$ -galaktozydaz wykorzystywanych w przemyśle mleczarskim do produkcji bezlaktozowego mleka, istnieją dwa alternatywne rozwiązania pozwalające na ulepszenie dotychczas stosowanej technologii. Zastosowanie enzymu aktywnego w niskiej temperaturze umożliwiłoby przeprowadzenie hydrolizy laktozy w warunkach chłodniczych i zapobiegło rozwojowi niepożądanego mikroflory podczas prowadzenia procesu. Natomiast wykorzystanie termostabilnej  $\beta$ -D-galaktozydazy pozwoliłoby na jednoczesną hydrolizę disacharydu i pasteryzację mleka.

## 2. Aktywności enzymatyczne $\beta$ -D-galaktozydaz

$\beta$ -D-galaktozydaza (EC 3.2.1.23) jest enzymem katalizującym reakcję hydrolizy wiązań O-glikozydowych w  $\beta$ -D-galaktozydach. Najbardziej znanym galaktozydem jest disacharyd występujący w mleku – laktoza. Katalizowana enzymatycznie reakcja hydrolizy wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowego w laktozie prowadzi do powstania cząsteczek D-glukozy i D-galaktozy (I). Niektóre  $\beta$ -D-galaktozydazy wykazują również

zdolność syntezy wiązań glikozydowych, która prowadzi do powstania łańcucha oligosacharydowego, gdy substratem reakcji jest laktoza (II).



Obie aktywności  $\beta$ -D-galaktozydazy – hydrolityczna i transferazowa są ze sobą nierozdzielnie związane, a ich mechanizm jest wspólny. Obejmuje on trzy następujące po sobie etapy, a ostatni z nich decyduje, czy zachodzi reakcja hydrolizy czy transglikozylacji:



W pierwszym etapie następuje wiązanie cząsteczki laktozy w centrum aktywnym  $\beta$ -D-galaktozydazy. Drugi etap obejmuje rozszczepienie disacharydu z udziałem reszt aminokwasowych enzymu o znaczeniu katalitycznym. Cząsteczka glukozy opuszcza wnękę katalityczną, zaś reszta galaktozylowa pozostaje związana z enzymem. W ostatnim etapie następuje przeniesienie reszty galaktozylowej na cząsteczkę akceptora i produkt reakcji opuszcza centrum aktywne  $\beta$ -D-galaktozydazy. Jeżeli akceptorem jest woda, uwolniona zostaje cząsteczka D-galaktozy. Jeżeli zaś rolę akceptora pełni cząsteczka cukru (laktoza lub jeden z produktów jej hydrolizy), powstaje galaktooligosacharyd (5). Reakcją preferowaną przez  $\beta$ -D-galaktozydazy jest na ogół reakcja hydrolizy. W celu zwiększenia efektywności reakcji transglikozylacji należy zwiększyć stężenie akceptora lub zastosować niskowodne środowisko reakcji. Wykazano, że akceptorem w reakcji transglikozylacji może być nie tylko cząsteczka cukru, ale również alkoholu (6), antybiotyku (7) lub pochodna aminokwasu (8). Dzięki temu  $\beta$ -D-galaktozydazy mogą znaleźć zastosowanie przy produkcji farmaceutyków i innych związków biologicznie czynnych.

### 3. Charakterystyka $\beta$ -D-galaktozydaz z różnych źródeł

$\beta$ -D-galaktozydaza jest enzymem syntetyzowanym przez komórki ssaków, roślin, drożdży, grzybów strzępkowych i bakterii. W zależności od źródła pochodzenia, enzymy różnią się masą cząsteczkową, liczbą podjednostek wchodzących

w skład natywnej cząsteczki, wartościami optymalnej temperatury i pH działania, a także zapotrzebowaniem na jony metali niezbędne dla aktywności enzymu lub/i stabilizacji jego struktury.  $\beta$ -D-galaktozydazy różnią się również spektrum substratowym, wrażliwością na działanie inhibitorów i aktywatorów oraz termostabilnością. Najbogatszym źródłem  $\beta$ -D-galaktozydaz o różnych właściwościach są mikroorganizmy. Niektóre z nich zdolne są do syntezy kilku różnych  $\beta$ -D-galaktozydaz, np. *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 wytwarza dwa enzymy (9), zaś z *Bacillus circulans* wyizolowano aż trzy różne  $\beta$ -D-galaktozydazy (10).

$\beta$ -D-galaktozydazy są najczęściej białkami oligomerycznymi. Jednym z wyjątków są enzymy syntetyzowane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, które występują w postaci monomeru. *A. niger* wytwarza trzy różne formy glikoproteiny o aktywności  $\beta$ -D-galaktozydazy, różniące się liczbą reszt cukrowych (11). Enzymy z *A. aculeatus* i *A. oryzae* są również monomerami (12-14).  $\beta$ -D-galaktozydazy z drożdży *K. fragilis* i *K. lactis* są homodimerami (15,16). Dwie identyczne podjednostki ma też enzym z psychrofilnej antarktycznej cyjanobakterii z rodzaju *Planococcus* (17). Wiele  $\beta$ -D-galaktozydaz ma postać tetrameru. Z czterech identycznych podjednostek składają się:  $\beta$ -D-galaktozydaza LacZ z *E. coli* (18), enzymy pochodzące z antarktycznych bakterii *Arthrobacter* (19) i *Pseudoalteromonas* sp. 22b (20),  $\beta$ -D-galaktozydaza z *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 ( $\beta$ -gal II) (9), czy enzym z *Penicillium chrysogenum* (21).

Źródło, z którego wyizolowano  $\beta$ -D-galaktozydazę decyduje najczęściej o optymalnych wartościach temperatury, pH oraz stężenia soli wymaganych do prowadzenia przez dany enzym efektywnej katalizy. Bywa jednak, że z organizmu mezofilnego można wyizolować enzym, którego optymalna temperatura działania będzie wynosiła nawet 85°C (22). Różnice w optymalnych wartościach temperatury i pH dla swojego działania mogą wykazywać też  $\beta$ -D-galaktozydazy pochodzące z jednego organizmu. Trzy enzymy wyizolowane z *Bacillus circulans* są tego doskonałym przykładem.  $\beta$ -D-galaktozydaza-I wykazuje najwyższą aktywność w 44°C i w buforze o pH 6,0, optymalne warunki działania dla  $\beta$ -D-galaktozydazy-II to pH 4,0 i 74°C, zaś dla  $\beta$ -D-galaktozydazy-III – pH 4,0 i 60°C (10). Wykorzystywane w przemyśle mleczarskim enzymy z drożdży są aktywne w środowisku obojętnym i lekko kwaśnym (pH 6,0-7,0), zaś  $\beta$ -D-galaktozydazy otrzymywane z grzybów strzępkowych wykazują najwyższą aktywność w pH 3,5-4,5 (23). Ciekawym enzymem jest  $\beta$ -D-galaktozydaza z halofilnego archaeona *Haloferax alicantei*, która maksymalną aktywność wykazuje w buforze zawierającym 4 M NaCl (24).

Z definicji  $\beta$ -D-galaktozydazy wynika, że podstawowym substratem enzymu jest laktoza. Jednak niektóre  $\beta$ -D-galaktozydazy nie rozkładają tego disacharydu. Dzieje się tak w przypadku jednego z enzymów wyizolowanych z *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083, który hydrolizuje wiązania glikozydowe w oligosacharydach powstałych z laktozy na drodze transglikozylacji, a nie wykazuje aktywności hydrolitycznej w stosunku do laktozy (9). W przeprowadzonych badaniach ujawniono, że również  $\beta$ -D-galaktozydaza z *Haloferax alicantei* nie hydrolizuje laktozy, wykazuje zaś zdolność hydrolizy wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych laktulozy (O- $\beta$ -D-galaktopiranozylo-(1 $\rightarrow$ 4)-D-frukto-

piranoza) (24). Niektóre  $\beta$ -D-galaktozydazy mają bardzo ograniczone spektrum substratowe i wykazują aktywność tylko w stosunku do  $\beta$ -D-galaktozydów (19,20,25). Inne zaś są mało specyficzne i hydrolizują zarówno  $\beta$ -D-galaktozydy, jak i  $\beta$ -D-glukozydy, np. enzymy z *Sulfolobus solfataricus* i *Pyrococcus furiosus* (26-28). Ze względu na szerokie spektrum substratowe, enzymy te często nazywane są  $\beta$ -glikozydazami. Enzym wyizolowany z *Rhodotorula minuta* IFO897 wykazuje aktywność hydrolityczną w stosunku do  $\beta$ -D-galaktozydów,  $\beta$ -D-glukozydów,  $\beta$ -D-fukozydów i  $\alpha$ -L-arabinozydów (29).

Jony metali nie tylko stabilizują strukturę enzymów, ale mogą też wpływać na ich aktywność, działając aktywująco lub pełniąc rolę inhibitora. Aktywność  $\beta$ -D-galaktozydaz zazwyczaj wzrasta, gdy w buforze znajdują się jony  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Jony metali ciężkich działają zaś jako inhibitory (23,26). Kationy  $\text{Ca}^{2+}$  również obniżają aktywność wielu  $\beta$ -D-galaktozydaz (16,23,26,30). Silnym aktywatorem enzymu z drożdży *K. lactis* i *K. fragilis* jest  $\text{Mn}^{2+}$ . Jony  $\text{Co}^{2+}$  także stymulują aktywność  $\beta$ -D-galaktozydazy z *K. fragilis* (15,16). W przypadku  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Mucor pusillus*, żaden z testowanych jonów ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) nie miał wpływu na aktywność enzymu (31). W celu określenia, czy enzym nie wymaga obecności jonów dwuwartościowych dla maksymalnej aktywności, często stosuje się kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA). Również związki zawierające grupy tiolowe mają wpływ na aktywność  $\beta$ -D-galaktozydaz. W badaniach wykazano, że enzym z *Pseudoalteromonas* sp. 22b jest silnie aktywowany przez ditiotreitrol (20), zaś na aktywność  $\beta$ -galaktozydazy z *Mucor pusillus* nie wpływają ani związki mające grupy tiolowe, ani EDTA (31). Stwierdzono również, że wspólna obecność  $\text{Mg}^{2+}$  i 2-merkaptotetanolu w mieszaninie reakcyjnej silnie aktywuje enzym z drożdży *K. lactis*. Sam 2-merkaptotetanol nie miał wpływu na aktywność  $\beta$ -D-galaktozydazy, zaś dodatek samego  $\text{Mg}^{2+}$  słabo ją aktywował. Możliwe jest, że związki te tworzą kompleks i dopiero on aktywuje  $\beta$ -D-galaktozydazę z *K. lactis* (16).

Podobnie jak wpływ jonów, tak i wpływ cukrów na aktywność  $\beta$ -D-galaktozydaz jest cechą specyficzną dla każdego z tych enzymów. Intensywnie badany jest przede wszystkim wpływ glukozy i galaktozy na przebieg reakcji hydrolizy laktozy. Stwierdzono, że 10 mM stężenie glukozy lub galaktozy powoduje zmniejszenie aktywności  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Thermus* 4-1A odpowiednio o 46 i 30% (32). Niekiedy tylko jeden z produktów hydrolizy laktozy wywiera dominujące oddziaływanie na aktywność enzymu, np. w przypadku  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Mucor pusillus*, roztwór galaktozy o stężeniu 10 mM powoduje spadek aktywności enzymu o 77,4%, a glukoza w tym samym stężeniu nie wpływa na jego aktywność (31). Glukoza jest natomiast inhibitorem  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Rhodotorula minuta* IFO879 (29).

Charakterystykę  $\beta$ -D-galaktozydaz pochodzących z różnych źródeł przedstawiono w tabeli.

#### 4. Charakterystyka termostabilnych $\beta$ -D-galaktozydaz

Od około 30 lat trwają prace nad izolacją i charakterystyką enzymów pochodzących z organizmów termofilnych. W 1972 r. została opisana termostabilna  $\beta$ -D-galaktozydaza wyizolowana z komórek termofilnej bakterii *Thermus* sp. T2. Mikroorganizm pochodził z gorącego źródła w Parku Narodowym Yellowstone w USA i był podobny morfologicznie do *Thermus aquaticus*. Duża ilość enzymu o aktywności  $\beta$ -D-galaktozydazy wytwarzana była w komórkach *Thermus* sp. T2 podczas ich hodowli w pożywce zawierającej galaktozę. Wyizolowany z tych komórek enzym miał masę cząsteczkową 570 kDa (33).  $\beta$ -D-galaktozydaza *Thermus* sp. T2 jest kodowana przez gen *bgaA*. Polipeptyd będący produktem ekspresji tego genu składa się z 645 reszt aminokwasowych. Obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej jego masa cząsteczkowa wynosi 73,595 kDa (34), co sugeruje, że enzym w formie natywnej jest oktamerem. Optymalne warunki działania enzymu to 80°C i pH 5,0. Maksymalną aktywność termostabilna  $\beta$ -D-galaktozydaza wykazuje jedynie w obecności jonów  $\text{Na}^+$ . Jony  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  są aktywatorami enzymu, zaś dodatek kationów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Co}^{2+}$  nie wpływa na jego aktywność (33). W innych badaniach wykazano natomiast, że jony  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  są inhibitorami tej  $\beta$ -D-galaktozydazy (15). Obecność cysteiny i 2-merkaptoetanolu w mieszaninie reakcyjnej powoduje zwiększenie aktywności tej  $\beta$ -D-galaktozydazy. Dodatek cysteiny wpływa ponadto na zwiększenie jej termostabilności (33).

Termostabilną  $\beta$ -D-galaktozydazę wyizolowano również z komórek bakterii *Thermus* sp. 4-1A (szcep izolowany w Nowej Zelandii). Podobnie jak w przypadku *Thermus* sp. T2, ekspresja genu kodującego enzym zachodziła najefektywniej po dodaniu do pożywki galaktozy. Masa cząsteczkowa enzymu wynosiła 440 kDa. Wszystkie oznaczenia aktywności enzymu w reakcji z ONPG (*o*-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd) wykonywano w 70°C i pH 6,0. Wykazano, że związki zawierające grupy tiolowe (cysteina, 2-merkaptoetanol, czy ditiotreitol) są aktywatorami enzymu z *Thermus* sp. 4-1A, zaś kwas jodoctowy (inhibitor enzymów zawierających w centrum aktywnym reszty cysteiny) całkowicie go inaktywuje. Silny wzrost aktywności  $\beta$ -D-galaktozydazy powoduje dodatek EDTA do mieszaniny reakcyjnej. Natomiast jony  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  są inhibitorami enzymu. Słaby wzrost aktywności zanotowano tylko w obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$ , zaś kationy  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Co}^{2+}$  nie wpływały na aktywność termostabilnej  $\beta$ -D-galaktozydazy. W badaniach nad wpływem cukrów na aktywność enzymu wykazano, że 10 mM stężenie laktozy, glukozy i galaktozy w mieszaninie reakcyjnej powoduje obniżenie aktywności enzymu odpowiednio o 22, 46 i 30%.  $\beta$ -D-galaktozydaza ze szczepu *Thermus* 4-1A jest wysoce termostabilnym enzymem. Po 20 godzinach inkubacji w 80°C zachowuje 83% początkowej aktywności. Dodanie 0,5% NaCl zwiększa termostabilność enzymu (32).

Scharakteryzowano również enzym wyizolowany z komórek termofilnych bakterii *Thermus* sp. A4 (szcep wyizolowany z gorących źródeł Atagawa w Japonii). Stwierdzono, że natywna cząsteczka enzymu jest monomerem. Na podstawie se-

kwencji nukleotydowej genu ustalono, że białko zbudowane jest z 645 reszt aminokwasowych, a jego masa cząsteczkowa wynosi 72,741 kDa i jest mniejsza od wyznaczonej dla tego białka z zastosowaniem techniki SDS-PAGE (75 kDa) i filtracji żelowej (86 kDa). Za optymalne warunki aktywności enzymu uznano pH 6,5 i temperaturę 70°C. W tej temperaturze enzym jest całkowicie stabilny i nawet po 20 godzinach inkubacji zachowuje pełną aktywność. Aktywatorami  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Thermus* sp. A4 są związki zawierające grupy –SH (ditiotreitol, cysteina i 2-merkaptioetanol), jony  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  oraz, w mniejszym stopniu, EDTA. Spadek aktywności enzymu powodują zaś jony  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$ . Obecność kationów  $\text{Mg}^{2+}$  w mieszaninie reakcyjnej nie ma wpływu na aktywność tej  $\beta$ -D-galaktozydazy. Nie zanotowano też inaktywacji enzymu pod wpływem kwasu jodooctowego. Podobnie jak w przypadku  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Thermus* 4-1A, 10 mM stężenie laktozy, glukozy i galaktozy w mieszaninie reakcyjnej powoduje obniżenie aktywności enzymu. Najsilniejszym inhibitorem jest galaktoza. W jej obecności aktywność enzymu jest o 40% niższa od poziomu uzyskanego dla próby kontrolnej nie zawierającej cukru. Termostabilna  $\beta$ -D-galaktozydaza z *Thermus* sp. A4 nie wykazywała aktywności transglikozylacyjnej w warunkach, w których prowadzono badania (35). Ciekawe wyniki dotyczące struktury  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Thermus* sp. A4 uzyskano na podstawie analizy kryształów enzymu. We wcześniejszych badaniach ustalono, że enzym wyizolowany z komórek *Thermus* sp. A4 występuje w postaci monomeru (filtracja żelowa, SDS-PAGE) (35). To samo białko wyizolowane z komórek rekombinowanego szczepu *E. coli* charakteryzowało się masą cząsteczkową 170 kDa, co sugerowało, że jest oligomerem zbudowanym z 2 lub 3 podjednostek. Na podstawie analizy kryształów enzymu jednoznacznie potwierdzono, że jest on homotrimerem. Różnice w stopniu oligomeryzacji  $\beta$ -D-galaktozydazy są najprawdopodobniej wynikiem zastosowania różnych procedur oczyszczania białka (36).

Termostabilną  $\beta$ -D-galaktozydazę wykazującą aktywność transglikozylacyjną wyizolowano z komórek *Thermus aquaticus* YT-1. Enzym ten będący oligomerem ma niezwykle dużą masę cząsteczkową, przekraczającą 700 kDa. Masa cząsteczkowa jednej podjednostki wynosi 59 kDa. Optymalne warunki działania  $\beta$ -D-galaktozydazy to pH 5,5 i 80°C. Enzym zachowuje ponad 80% aktywności w zakresie temperatur 65-85°C. Powyżej 85°C aktywność enzymu gwałtownie spada na skutek denaturacji termicznej, ale obecność  $\text{CaCl}_2$  powoduje zwiększenie jego termostabilności. Jony  $\text{Ca}^{2+}$  są najsilniejszymi aktywatorami  $\beta$ -D-galaktozydazy z *T. aquaticus* YT-1. Zwiększenie aktywności enzymu powodują również kationy  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oraz jony  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  i  $\text{K}^+$ . W obecności kationów  $\text{Mn}^{2+}$  nie zanotowano zmian aktywności enzymu, zaś jony  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  ją obniżały. Aktywatorami  $\beta$ -D-galaktozydazy są związki mające grupy tiolowe, zaś kwas jodooctowy i inne inhibitory enzymów zawierających w centrum aktywnym reszty cysteiny, powodują inaktywację enzymu.  $\beta$ -D-galaktozydaza katalizuje reakcję hydrolizy wiązań glikozydowych w  $\beta$ -D-galaktozydach i  $\beta$ -D-glukozydach, wykazuje jednak większe powinowactwo do *o*-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu i *p*-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu niż do *p*-nitrofe-

nylo- $\beta$ -D-glukopiranozydu. Produkty hydrolizy laktozy są inhibitorami tej  $\beta$ -D-galaktozydazy. Glukoza powoduje silniejszy efekt inhibicji niż galaktoza. Enzym wykazuje ponadto aktywność transglikozylacyjną. Głównymi produktami reakcji transglikozylacji, której substratem jest laktoza, są tri- i tetrasacharydy (37).

Źródłem termostabilnej  $\beta$ -D-galaktozydazy mogą być też termofilne grzyby *Rhizomucor* sp., bakterie *Bacillus coagulans* RCS3 lub mezofilne drożdże *Sterigmatomyces elviae* CBS8119.

Termofilne grzyby strzępkowe *Rhizomucor* sp. produkują zewnątrzkomórkową  $\beta$ -D-galaktozydazę o masie cząsteczkowej 250 kDa. Enzym jest glikoproteiną i występuje w postaci dimeru. Masa cząsteczkowa jednej podjednostki wynosi 120 kDa. Optymalne warunki działania tej  $\beta$ -galaktozydazy to pH 4,5 i temperatura 60°C. W tej temperaturze enzym zachowuje stabilność przez 4 godziny, zaś w temperaturze 70°C jego czas półtrwania wynosi 150 minut.  $\beta$ -D-galaktozydaza z *Rhizomucor* sp. wykazuje wysoką specyficzność substratową. Hydrolizuje tylko wiązania glikozydowe w  $\beta$ -D-galaktozydach. Obecność jonów  $K^+$ ,  $Na^+$  oraz  $Mg^{2+}$  i innych kationów dwuwartościowych w mieszaninie reakcyjnej nie ma wpływu na aktywność enzymu. Po wykonaniu intensywnej dializy wobec buforu zawierającego EDTA potwierdzono, że  $\beta$ -D-galaktozydaza z *Rhizomucor* sp. nie wymaga jonów metali do zachowania pełnej aktywności. Kationy  $Hg^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  oraz galaktoza i IPTG (izopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozyd) są inhibitorami enzymu (38).

Zewnątrzkomórkowa termostabilna  $\beta$ -D-galaktozydaza jest produkowana przez termofilny szczep *Bacillus coagulans* RCS3. Maksymalną aktywność enzym wykazuje w temperaturze 65°C i pH 6,8. Pozostaje ona na wysokim poziomie w pH 6,0-7,0 i temperaturze 63-67°C. Za optymalną temperaturę działania enzymu przyjęto 63°C, bo w tych warunkach  $\beta$ -D-galaktozydaza wykazuje wysoką stabilność termiczną (czas półtrwania enzymu wynosi 15 godzin). Silnymi inhibitorami enzymu są jony  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  i  $Ni^{2+}$  oraz galaktoza. Kationy  $Mn^{2+}$  powodują słabą aktywację, podobnie jak wysokie stężenie EDTA (20 mM) (39).

Termostabilna  $\beta$ -D-galaktozydaza syntetyzowana w komórkach *Sterigmatomyces elviae* CBS8119 związana jest ze ścianą komórkową mikroorganizmu. Po enzymatycznej lizie komórek drożdży, enzym izolowano, z frakcji zawierającej nierozpuszczalne ich fragmenty, głównie ściany komórkowe. Masa cząsteczkowa  $\beta$ -D-galaktozydazy z *S. elviae* wynosi 170 kDa. W formie natywnej enzym jest dimerem złożonym z podjednostek o masie cząsteczkowej 86 kDa. Optymalne pH działania  $\beta$ -D-galaktozydazy obejmuje zakres 4,5-5,0. Najwyższą aktywność enzym uzyskuje w 85°C w pH 5,0. Wykazano, że  $\beta$ -D-galaktozydaza z *S. elviae* jest wysoce termostabilnym enzymem. Po 60-minutowej inkubacji w 80 i 85°C zachowuje odpowiednio 90 i 62% początkowej aktywności. Inhibitorami enzymu są jony  $Hg^{2+}$  i  $Pb^{2+}$ . W przypadku innych dwuwartościowych kationów metali, EDTA, kwasu jodooctowego, czy ditiotretolu nie stwierdzono wpływu na aktywność enzymu.  $\beta$ -D-galaktozydaza z *S. elviae* wykazuje małą specyficzność substratową. Katalizuje reakcję hydrolizy nie tylko  $\beta$ -D-galaktozydów, ale również  $\beta$ -D-glukozydów,  $\beta$ -D-fukozydów i  $\beta$ -L-arabinozydów.

Tabela

Charakterystyka  $\beta$ -galaktozydaz pochodzących z różnych źródeł

		Źródło $\beta$ -D-galaktozydazy											
		Mikroorganizmy psychrofilne						Mikroorganizmy mezofilne					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
B	B	B	B	B	B	B	D	D	GS	GS	GS		
<i>Arthrobacter</i> sp. SB	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b	<i>Planococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Leuconastoc</i> *	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083	<i>Kluyveromyces lactis</i> Y1140	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> RT102	<i>Aspergillus aculeatus</i>		
Masa cząsteczkowa (kDa)	463	490	465	nb	212 145 86	350	270 <sup>a</sup>	200	124 <sup>b*</sup> 150 <sup>b*</sup> 173 <sup>b*</sup>	105	120 <sup>b</sup>		
Liczba monomerów	4	4	4	nb	1	4	2	2	1	1	1		
Optymalna temp. działania (°C)	15 – 20 <sup>c</sup>	40	55	43 – 58	44 74 60	35	nb <sup>c</sup>	40 <sup>f</sup>	30 37 60	46	55 – 60		
Optymalne pH działania	7,0	6,0 – 8,0	6,0 – 8,0	7,2 – 7,5	6,0 4,0 4,0	6,0	6,9 – 7,3	6,5 – 6,8	2,5 – 4,0	4,5	5,4		
Aktywność transglukozylacyjna	nb	nb	+	nb	+	nb	+	+	nb	nb	+		
Literatura	19	20 25	18 25 48 52	30	10 57	9	16	15 54 56	11	13 14	12		

Tabela cd.

Charakterystyka β-galaktozydaz pochodzących z różnych źródeł

		Źródło β-D-galaktozydazy													
		Mikroorganizmy termofile													
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
	GS	GS	GS	B	D	D	GS	B	B	B	B	B	B	B	
	<i>Micor pusillus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Haloferax altamnei</i>	<i>Rhodoblorula minuta</i> IF0879	<i>Sterigmatomyces elbiae</i> CBS8119	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>Bacillus coagulans</i> RC83	<i>Thermus</i> sp. T2	<i>Thermus</i> sp. 4-1A	<i>Thermus</i> sp. A4	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	<i>Sulfolobus solfataricus</i> MT-4	<i>Pyrococcus toioset</i>		
Masa cząsteczkowa (kDa)	131 <sup>b</sup>	270	180	144 <sup>b</sup>	170	250 <sup>b</sup>	nb	570	440	86 <sup>#</sup> 170 <sup>#</sup>	>700	240	60 <sup>#</sup> 122 <sup>#</sup>		
Liczba monomerów	1	4	2	2	2	2	nb	8	nb	1 <sup>#</sup> 3 <sup>#</sup>	12	4	1 <sup>#</sup> 2 <sup>#</sup>		
Optymalna temp. działania (°C)	65	30	nb <sup>d</sup>	70	85	60	63 67 <sup>c*</sup>	80	nb <sup>e*</sup>	70	80	95	92 – 93		
Optymalne pH działania	4,0	4,0 – 5,0	nb <sup>d</sup>	4, – 5,2	4,5 – 5,0	4,5	6,0 7,0 <sup>e*</sup>	5,0	6,0	6,5	5,5	6,5	5,4		
Aktywność transglikozylacyjna	nb	nb	nb	+	+	nb	nb	+	nb	–	+	+	+		
Literatura	31	21	24	29	22 53	38	39	15 33 34	32	35 36	37	27 40 43	45 47		

Objaśnienia skrótów:

a – wartość obliczona (2 × 135 kDa); B – bakterie; b – glikoproteina; b\* – trzy formy glikoproteiny różniące się zawartością cukrów; c – maksymalną aktywność enzymu zanotowano w 18°C, w pH 7,0; c\* – maksymalną aktywność enzymu zanotowano w 65°C, w pH 6,8; D – drożdże; d – pomiary aktywności enzymu prowadzono w temperaturze pokojowej, w pH 7,2; e – pomiary aktywności enzymu prowadzono w 30°C; e\* – pomiary aktywności enzymu prowadzono w 70°C; f – temperatura, w której enzym wykazuje wysoką aktywność i stabilność, jednak maksymalną aktywność enzymu zanotowano w 50°C i pH 6,5; GS – grzyby strzępkowe; nb – nie badano; # – badano 6 szczepów (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 19D, 6M, 18F i 19M; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* 195; *Leuconostoc lactis* S3); # – wyniki uzyskane przez różnych badaczy.

Enzym ma też wysoką aktywność transglikozylacyjną. Wydajność reakcji transglikozylacji prowadzonej przez 24 godziny w 60°C i pH 5,0 wynosi 39%. Głównymi produktami są tri- i tetrasacharydy oraz niewielka ilość oligosacharydów o wyższym stopniu polimeryzacji (22).

Enzym o aktywności  $\beta$ -D-galaktozydazy wyizolowano również z komórek hipertermofilnego archaeona *Sulfolobus solfataricus*. Masa cząsteczkowa tej  $\beta$ -D-galaktozydazy wynosi 240 kDa. W formie natywnej enzym jest tetrametrem złożonym z podjednostek o masie 60 kDa. Najwyższą aktywność w reakcji z ONPG wykazuje w temperaturze 95°C i pH 6,5.  $\beta$ -D-galaktozydaza z *S. solfataricus* nie wymaga obecności dwuwartościowych jonów metali do zachowania wysokiej aktywności. Związki zawierające grupy sulfhydrylowe powodują słabą aktywację enzymu. Natomiast obecność pCMB (inhibitora enzymów zawierających w centrum aktywnym reszty cysteiny) nie powoduje inaktywacji  $\beta$ -D-galaktozydazy. D-galaktoza nie zmienia aktywności enzymu w reakcji hydrolizy ONPG (40), jest natomiast słabym inhibitorem w reakcji hydrolizy laktozy (41). W badaniach nad wpływem D-glukozy na aktywność hydrolityczną termostabilnej  $\beta$ -D-galaktozydazy, prowadzonych przez dwa niezależne zespoły badawcze wykazano, że jest ona słabym inhibitorem (40) lub też aktywatorem enzymu (41).  $\beta$ -D-galaktozydaza z *S. solfataricus* wykazuje niezwykłą termostabilność. Jej czas półtrwania w 75, 80 i 85°C wynosi odpowiednio 24, 10 i 3 godziny (40). Enzym charakteryzuje się szerokim spektrum substratowym. Katalizuje reakcję hydrolizy wiązań glikozydowych w syntetycznych  $\beta$ -D-galaktozydach,  $\beta$ -D-glukozydach i  $\beta$ -D-fukozydach. Wykazuje również aktywność hydrolityczną w stosunku do laktozy, celobiozy (O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukopiranoza) i oligomerów glukozy o stopniu polimeryzacji 3 i 4 (aktywność egzoglukozydazy) (27). Szerokim spektrum substratowym charakteryzuje się również termostabilny enzym z archaeona *Pyrococcus furiosus*. Wykazuje on jednak wyższą aktywność hydrolityczną w stosunku do  $\beta$ -D-glukozydów syntetycznych i naturalnych (*p*-nitrofenylo- $\beta$ -D-glukopiranozyd, celobioza), niż  $\beta$ -D-galaktozydów (*p*-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd, laktoza). Z tego względu enzym ten został zakwalifikowany do  $\beta$ -D-glukozydaz (28). Mimo to prowadzono badania nad wykorzystaniem obu hydrolaz glikozydowych ( $\beta$ -D-galaktozydazy z *S. solfataricus* i  $\beta$ -D-glukozydazy z *P. furiosus*) zarówno do hydrolizy laktozy, jak i syntezy oligosacharydów z laktozy w wysokiej temperaturze (41,42).

Geny kodujące termostabilne enzymy z *Thermus* sp. T2, *S. solfataricus*, czy *P. furiosus* klonowano w komórkach *E. coli*. Prowadzono również wydajną biosyntezę termostabilnych enzymów w komórkach mezofilnego gospodarza i wykazano, że rekombinowane białka mają zbliżone właściwości do enzymów wyizolowanych z naturalnego źródła (34,41,43,44).

W Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej skonstruowano szereg układów ekspresyjnych pozwalających na wydajną biosyntezę termostabilnej  $\beta$ -D-galaktozydazy z hipertermofilnego archaeona *Pyrococcus woesei* (DSM 3773) w komórkach *E. coli* i *Pichia pastoris* (45-47). Gen kodujący termostabilne białko został zidentyfikowany i zsekwencjonowany. Na podstawie sekwencji nukleotydowej genu ustalono se-

kwencję aminokwasową kodowanego polipeptydu. Obliczona masa cząsteczkowa jednej podjednostki enzymu wynosi 59,056 kDa.  $\beta$ -D-galaktozydaza została oczyszczona i scharakteryzowana. Wyznaczona metodą filtracji żelowej masa cząsteczkowa białka wynosi 60 kDa (46) lub 122 kDa (47). Najwyższą aktywność hydrolityczną enzym wykazuje w pH 5,4 i 92-93°C (45-47). Enzym ma też aktywność transglikozylacyjną. Jego aktywatorami są związki zawierające grupy tiolowe, jony  $Mg^{2+}$  i D-galaktoza, a inhibitorami jony metali ciężkich i D-glukoza. Natomiast obecność kationów  $Ca^{2+}$  w mieszaninie reakcyjnej nie ma wpływu na aktywność tej  $\beta$ -D-galaktozydazy. Enzym nie wymaga obecności dwuwartościowych jonów metali do zachowania wysokiej aktywności. Po dializie wobec buforu zawierającego EDTA nie stwierdzono obniżenia jego aktywności (47).

Charakterystykę termostabilnych  $\beta$ -D-galaktozydaz zaprezentowano w tabeli.

## 5. Zastosowanie $\beta$ -D-galaktozydaz

$\beta$ -D-galaktozydazę, enzym katalizujący reakcję hydrolizy laktozy, wykorzystuje się głównie w procesach produkcji mleka o niskiej zawartości laktozy, przeznaczonego dla osób cierpiących z powodu nietolerancji tego disacharydu. Mleko o obniżonej zawartości laktozy produkowane jest na skalę przemysłową w wielu krajach, z zastosowaniem różnych technologii. W Kanadzie produkcja mleka bezlaktozowego polega na aseptycznym dodawaniu preparatu  $\beta$ -D-galaktozydazy do mleka UHT po sterylizacji, w czasie napełniania kartonów. Następnie mleko poddaje się kilkudniowej inkubacji. Inną metodę stosuje się w Japonii. Mleko szczepi się kulturą *Lactobacillus*, inkubuje przez 4 godziny, a następnie poddaje sonifikacji. Inkubację kontynuuje się przez następne 12 godzin, co prowadzi do uzyskania 71-74% stopnia redukcji laktozy. W USA, oprócz przemysłowo produkowanego mleka bezlaktozowego, dostępne są preparaty enzymatyczne służące do domowej hydrolizy laktozy. Do mleka dodaje się 5-15 kropli preparatu i inkubuje przez 24 godziny (58). W wielu krajach dostępne są również tabletki zawierające  $\beta$ -D-galaktozydazę, które należy przyjmować przed wypiciem mleka. W Polsce mleko o obniżonej zawartości laktozy produkowane jest przez SM „Maćkowy” w Gdańsku.

Mleko ze zhydrolizowaną laktozą wykorzystywane jest do produkcji jogurtów. W technologii wytwarzania jogurtu stosowane są tzw. szczepionki jogurtowe, zawierające szczepy bakterii *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*. Mikroorganizmy te mają zdolność fermentacji laktozy. Zastosowanie mleka poddanego wcześniej działaniu  $\beta$ -D-galaktozydazy, w celu rozłożenia laktozy na cukry proste (D-glukozę i D-galaktozę), stymuluje rozwój tych bakterii, co pozwala na znaczne skrócenie czasu fermentacji. Produkty hydrolizy laktozy są ponadto znacznie od niej słodsze. Stąd wykorzystanie do produkcji jogurtów mleka ze zhydrolizowanym disacharydem eliminuje konieczność dodawania do nich sacharozy jako środka słodzącego, co znacznie obniża kaloryczność gotowych wyrobów.

Mleko o obniżonej zawartości laktozy stosować można do produkcji mleka skondensowanego i lodów w celu wyeliminowania wady „piaszczystości”, która prowadzi do pogorszenia ich właściwości organoleptycznych. Mączny lub piaszczysty posmak produktów powstaje na skutek krystalizacji laktozy podczas zagęszczania lub/i pod wpływem niskiej temperatury stosowanej w procesach technologicznych.

Dodatek  $\beta$ -D-galaktozydazy przy produkcji twarogu skraca czas krzepnięcia mleka, zaś sery wyprodukowane z mleka z dodatkiem enzymu szybciej dojrzewają.

Enzymatyczna hydroliza laktozy zawartej w serwatce prowadzi do otrzymania syropu glukozowo-galaktozowego. Syrop ten może zastąpić mleko odtłuszczone i sacharozę w produktach piekarskich, cukierniczych i mrożonych produktach mlecznych. Można go też stosować jako zamiennik cukru czy syropu glukozowego w produkcji napojów.

Suszona serwatka ze zhydrolizowaną laktozą może być wykorzystana również jako dodatek do pasz dla trzody chlewnej, bydła i zwierząt futerkowych. Zagospodarowanie serwatki będącej uciążliwym produktem ubocznym przemysłu mleczarskiego ma ogromne znaczenie dla ochrony środowiska. Obecnie znaczna część serwatki traktowana jest jako odpad i podlega utylizacji lub czasami trafia do ścieków.

Wykorzystanie transglikozylacyjnej aktywności  $\beta$ -D-galaktozydazy umożliwia produkcję oligosacharydów glukozowo-galaktozowych, stosowanych jako cenne dodatki do żywności. Ze względu na swoje właściwości, oligosacharydy zaliczone zostały do składników żywności funkcjonalnej, czyli takiej, która oprócz tradycyjnie uznanej wartości odżywczej, wywiera również korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Od 1991 r., kiedy Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej Japonii nadało status FOSHU (*Foods for Specified Health Use*) czterem typom oligocukrów (fruktooligosacharydy, galaktooligosacharydy, palatynozooligosacharydy i oligosacharydy z ziaren soi) (59), prowadzone są intensywne badania nad właściwościami, sposobami produkcji i zastosowaniem różnych typów oligosacharydów. Obecnie na świecie produkuje się ponad 20 rodzajów oligocukrów nie ulegających rozkładowi pod wpływem ludzkich enzymów trawiennych (NDOs). Niektóre izolowane są z naturalnych źródeł na drodze ekstrakcji (oligosacharydy z ziaren soi), otrzymuje się je również poprzez enzymatyczną hydrolizę polisacharydów (ksylo- i izomaltooligosacharydy) lub jako produkt katalizowanej enzymatycznie reakcji transglikozylacji (frukto- i galaktooligosacharydy) (59,60).

Galaktooligosacharydy (GOS) to węglowodany złożone z cząsteczek D-glukozy i D-galaktozy połączonych wiązaniami glikozydowymi. Tak jak inne NDOs, galaktooligosacharydy nie ulegają hydrolizie pod wpływem działania ludzkich enzymów trawiennych. Są natomiast substratem reakcji fermentacji prowadzonej przez specyficzne gatunki bakterii zasiedlające jelito grube. Podstawową zaletą GOS (a także innych oligosacharydów) jest zdolność do stymulowania rozwoju i aktywności szczepów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* w okrężnicy. Sprzyja to utrzymaniu równowagi w składzie mikroflory jelitowej, hamuje rozwój bakterii chorobotwórczych (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*) i w efekcie zapobiega infekcjom. Spoży-

wanie oligosacharydów pomaga też w odbudowie naturalnej mikroflory jelitowej po kuracji antybiotykowej. Ponadto dieta zawierająca galaktooligosacharydy sprzyja obniżeniu poziomu cholesterolu we krwi, zapobiega nadciśnieniu, a także zmniejsza ryzyko powstawania nowotworów jelita grubego (60,61). Ze względu na wymienione prozdrowotne właściwości galaktooligosacharydów, znalazły one zastosowanie jako dodatek do żywności, głównie jogurtów i napojów mlecznych zawierających żywe kultury bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. GOS stosowane są również jako dodatek do odżywek dla niemowląt (59).

Galaktooligosacharydy nie ulegają hydrolizie pod wpływem ludzkich enzymów trawiennych, posiadają zatem niższą wartość energetyczną od sacharozy. Dzięki temu znalazły zastosowanie jako środek słodzący przy produkcji napojów, słodczy, dżemów, a także pieczywa. Ich duża zdolność wiązania wody powoduje ponadto, że pieczywo długo pozostaje świeże. GOS są odporne na wysoką temperaturę i zachowują swoje właściwości po obróbce cieplnej żywności.

Na skalę przemysłową galaktooligosacharydy produkowane są z laktozy z zastosowaniem enzymów  $\beta$ -D-galaktozydaz wykazujących aktywność transglikozylacyjną. Komercyjnie dostępne GOS są mieszaniną galaktooligosacharydów o różnej długości, laktozy oraz D-glukozy i D-galaktozy. Procentowy skład mieszaniny i budowa chemiczna oligosacharydów uzależnione są od źródła enzymu, stężenia substratu i warunków prowadzenia reakcji.

Stosując  $\beta$ -D-galaktozydazę z *Bacillus circulans* lub *Cryptococcus laurentii* uzyskuje się galaktooligosacharydy, w których podjednostki cukrowe połączone są głównie wiązaniami  $\beta$ -1,4-glikozydowymi. Jeżeli reakcja transglikozylacji katalizowana jest przez enzym wyizolowany z *Aspergillus oryzae* lub *Streptococcus thermophilus*, w cząsteczkach oligocukrów występują przede wszystkim wiązania  $\beta$ -1,6-glikozydowe (60). Ponadto w przypadku stosowania  $\beta$ -D-galaktozydazy z *A. oryzae* głównym produktem reakcji są trisacharydy (57,60,62), zaś użycie enzymu z *B. circulans* pozwala na uzyskanie, obok trisacharydów, stosunkowo dużej ilości tetra- i pentasacharydów (57,60).

Największa ilość oligosacharydów o stopniu polimeryzacji 3-6 powstaje przy wysokim stężeniu laktozy (5,57,60,62). W przypadku niskiego stężenia substratu w mieszaninie reakcyjnej, głównymi produktami reakcji są disacharydy, w których cząsteczki glukozy i galaktozy połączone są innymi wiązaniami niż w laktozie – alolaktoza i galaktobioza (5). Stężony roztwór laktozy otrzymywany jest głównie z serwatki, w której zawartość tego disacharydu dochodzi do 80% suchej masy.

Dobór temperatury i pH w jakich prowadzona jest reakcja transglikozylacji uzależniony jest od właściwości stosowanej  $\beta$ -D-galaktozydazy. Podwyższenie temperatury wpływa przede wszystkim na zwiększenie rozpuszczalności laktozy i pozwala uzyskać wyższe stężenie początkowe substratu, które ma ogromny wpływ na wydajność procesu. Chroni też przed zanieczyszczeniem środowiska reakcji niepożądaną mikroflorą. Wysokość temperatury limitowana jest stabilnością termiczną enzymu. Z tego powodu coraz częściej prowadzone są badania nad wykorzystaniem termostabilnych  $\beta$ -D-galaktozydaz do syntezy oligosacharydów (42,63).

Wzrastające zapotrzebowanie na galaktooligosacharydy skłania do poszukiwania nowych  $\beta$ -D-galaktozydaz wykazujących wysoką aktywność transglikozylacyjną, a także wydajnych metod immobilizacji enzymów pozwalających na produkcję GOS w przemysłowych procesach ciągłych (22,62,64).

W procesach przemysłowych wykorzystywane są hydrolazy glikozydowe pochodzące z organizmów mezofilnych: grzybów strzępkowych *Aspergillus niger* i *Aspergillus oryzae* oraz drożdży *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces fragilis*. Enzymy te posiadają status substancji GRAS (*Generally Recognized as Safe*) nadany przez U.S. Food and Drug Administration (FDA) (65).  $\beta$ -D-galaktozydazy izolowane z grzybów strzępkowych, wykazujące wysoką aktywność przy pH 3,5-4,5, stosowane są do hydrolizy laktozy w kwaśnej serwatce. Natomiast enzymy pochodzące z drożdży, aktywne w zakresie pH 6,0-7,0, wykorzystuje się w przetwórstwie mleka i słodkiej serwatki (23).

## 6. Uwagi końcowe

Enzymy jako katalizatory reakcji chemicznych znalazły szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Istnieje jednak wiele problemów związanych z ich praktycznym wykorzystaniem. Czynnikiem limitującym jest ich wysoka cena. Wiąże się ona przede wszystkim z dużymi kosztami związanymi z ich izolacją i oczyszczeniem. Poważną wadą katalizatorów białkowych jest stosunkowo szybka utrata aktywności, związana z niestabilnością ich struktury, po wyizolowaniu z naturalnego środowiska jakim jest żywa komórka. Enzymy są wrażliwe na zmiany warunków fizykochemicznych, takich jak: temperatura, pH, czy obecność substancji pełniących rolę aktywatorów lub inhibitorów. Przez długi czas uważano również, że biokatalizatory mogą działać tylko w środowisku wodnym, co znacznie ograniczało zakres ich stosowania. Bardzo ważna dla przydatności enzymu w procesach przemysłowych jest cena i ilość dostępnego komercyjnie biokatalizatora. Obecnie większość enzymów wytwarzana jest przez rekombinowane szczepy drobnoustrojów, dzięki czemu są znacznie tańsze od białek wyizolowanych z komórek ich naturalnego producenta. Biosynteza termostabilnych  $\beta$ -D-galaktozydaz w komórkach mezofilnych gospodarzy (np. *E. coli*), znacznie ułatwia proces ich oczyszczania. Znaczną czystość preparatu można uzyskać już we wstępnym etapie polegającym na termicznej denaturacji białek mezofilnego mikroorganizmu. Uproszczenie metodyki oczyszczania bioproduktu zwiększa wydajność procesu i znacznie redukuje związane z nim koszty. Ponadto zwarta struktura cząsteczek termostabilnych białek sprawia, że są one mniej podatne na zmiany konformacji spowodowane tworzeniem wiązań pomiędzy enzymem a złożem w procesie immobilizacji. Dzięki temu unieruchomione termostabilne biokatalizatory zachowują wysoką aktywność. Immobilizacja  $\beta$ -D-galaktozydaz umożliwia stosowanie ich w procesach ciągłych. W tym przypadku występuje jednak duże prawdopodobieństwo zanieczyszczenia mikrobiologicznego bioreakto-

ra. Prowadzenie reakcji w wysokiej temperaturze z zastosowaniem enzymów termostabilnych całkowicie eliminuje to niebezpieczeństwo. Pozwala również na jednoczesne wytwarzanie produktów i ich obróbkę cieplną, co jest niezwykle użyteczne w przemyśle spożywczym.

## Literatura

1. Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., (2002), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 345-351.
2. Raso J. P., Voss E., (2001), *Appl. Catal. A: General.*, 221, 145-158.
3. van Beilen J. B., Li Z., (2002), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 338-344.
4. Synowiecki J., (1998), *Biotechnologia*, 3, 42, 98-105.
5. Mahoney R. R., (1998), *Food Chem.*, 63, 147-154.
6. Stevenson D. E., Stanley R. A., Furneaux R. H., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 657-666.
7. Scheckermann C., Wagner F., Fischer L., (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 629-634.
8. van Rantwijk F., Woudenberg-van Oosterom M., Sheldon R. A., (1999), *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 6, 511-532.
9. van Laere K. M. J., Abee T., Schols H. A., Beldman G., Voragen A. G. J., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1379-1384.
10. Vetere A., Paoletti S., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1380, 223-231.
11. Widmer F., Leuba J-L., (1979), *Eur. J. Biochem.*, 100, 559-567.
12. van Casteren W. H. M., Eimermann M., van den Broek L. A. M., Vincken J-P., Schols H. A., Voragen A. G. J., (2000), *Carb. Res.*, 329, 75-85.
13. Tanaka Y., Kagamiishi A., Kiuchi A., Horiuchi T., (1975), *J. Biochem.*, 77, 241-247.
14. Akasaki M., Suzuki M., Funakoshi I., Yamashina I., (1976), *J. Biochem.*, 80, 1195-1200.
15. Ladero M., Santos A., Garcia J. L., Carrascosa A. V., Pessela B. C. C., Garcia-Ochoa F., (2002), *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 392-405.
16. Dickson R. C., Dickson L. R., Markin J. S., (1979), *J. Bacteriol.*, 137, 51-61.
17. Sheridan P. P., Brenchley J. E., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2438-2444.
18. Jacobson R. H., Zhang X-J., DuBose R. F., Matthews B. W., (1994), *Nature*, 369, 761-766.
19. Coker J. A., Sheridan P. P., Loveland-Curtze J., Gutshall K. R., Auman A. J., Brenchley J. E., (2003), *J. Bacteriol.*, 185, 5473-5482.
20. Turkiewicz M., Kur J., Białkowska A., Cieśliński H., Kalinowska H., Bielecki S., (2003), *Biomol. Eng.*, 20, 317-324.
21. Nagy Z., Kiss T., Szentirmai A., Biro S., (2001), *Protein Expr. Purif.*, 21, 24-29.
22. Onishi N., Tanaka T., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4026-4030.
23. Kowalewska-Piontas J., (1993), *Przegląd Mleczarski*, 3, 197-200.
24. Holmes M. L., Scopes R. K., Moritz R. L., Simpson R. J., Englert C., Pfeifer F., Dyll-Smith M. L., (1997), *Biochim. Biophys. Acta*, 1337, 276-286.
25. Cieśliński H., Kur J., Białkowska A., Baran I., Makowski K., Turkiewicz M., (2005), *Protein Expr. Purif.*, 39, 27-34.
26. Synowiecki J., Maciuńska J., (2000), *Biotechnologia*, 1, 48, 117-123.
27. Nucci R., Moracci M., Vaccaro C., Vespa N., Rossi M., (1993), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17, 239-250.
28. Kengen S. W. M., Luesink E. J., Stams A. J. M., Zehnder A. J. B., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 213, 305-312.
29. Onishi N., Tanaka T., (1996), *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 439-443.
30. Huang D. Q., Prevost H., Davies C., (1995), *Int. Dairy J.*, 5, 29-43.
31. Ismail S. A., Mabrouk S. S., Mahoney R. R., (1997), *J. Food Biochem.*, 21, 145-162.
32. Cowan D. A., Daniel R. M., Martin A. M., Morgan H. W., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1141-1145.
33. Ulrich J. T., McFeters G. A., Temple K. L., (1972), *J. Bacteriol.*, 110, 691-698.

34. Vian A., Carrascosa A. V., Garcia J. L., Cortes E., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2187-2191.
35. Ohtsu N., Motoshima H., Goto K., Tsukasaki F., Matsuzawa H., (1998), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1539-1545.
36. Hidaka M., Fushinobu S., Ohtsu N., Motoshima H., Matsuzawa H., Shoun H., Wakagi T., (2002), *J. Mol. Biol.*, 322, 79-91.
37. Berger J.-L., Lee B. H., Lacroix C., (1997), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 25, 29-41.
38. Shaikh S. A., Khire J. M., Khan M. I., (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, 1472, 314-322.
39. Batra N., Singh J., Banerjee U. C., Patnaik P. R., Sobti R. C., (2002), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 36, 1-6.
40. Pisani F. M., Rella R., Raia C. A., Rozzo C., Nucci R., Gambacorta A., de Rosa M., Rossi M., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 187, 321-328.
41. Petzelbauer I., Nidetzky B., Haltrich D., Kulbe K. D., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 322-332.
42. Petzelbauer I., Zeleny R., Reiter A., Kulbe K. D., Nidetzky B., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 140-149.
43. Moracci M., Nucci R., Febbraio F., Vaccaro C., Vespa N., la Cara F., Rossi M., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 992-997.
44. Pessela B. C. C., Vian A., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Garcia J. L., Guisan J. M., Carrascosa A. V., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1967-1972.
45. Dąbrowski S., Maciuńska J., Synowiecki J., (1998), *Mol. Biotechnol.*, 10, 217-222.
46. Maciuńska J., (1999), *Otrzymywanie i właściwości termostabilnych  $\beta$ -D-galaktozydaz wytwarzanych przez *Thermus thermophilus* i zmodyfikowaną genetycznie *Escherichia coli**, rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska.
47. Wanarska M., (2005), *Termostabilna  $\beta$ -D-galaktozydaza *Pyrococcus woesei* – konstrukcja nowych systemów ekspresyjnych, oczyszczanie, charakterystyka i immobilizacja enzymu*, rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska.
48. [www.prozyme.com](http://www.prozyme.com)
49. Reithel F. J., Newton R. M., Eagleson M., (1966), *Nature*, 210, 1265.
50. Shifrin S., Grochowski B. J., Luborsky S. W., (1970), *Nature*, 227, 608-609.
51. Lederberg J., (1950), *J. Bacteriol.*, 60, 381-392.
52. Ladero M., Santos A., Garcia J. L., Garcia-Ochoa F., (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 29, 181-193.
53. Onishi N., Yamashiro A., Yokozeki K., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4022-4025.
54. Roy I., Gupta M. N., (2003), *Proc. Biochem.*, 39, 325-332.
55. Santos A., Ladero M., Garcia-Ochoa F., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 558-567.
56. Rustom I. Y. S., Foda M. I., Lopez-Leiva M. H., (1998), *Food Chem.*, 62, 141-147.
57. Boon M. A., Janssen A. E. M., van't Riet K., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 271-281.
58. Bielecka M., (1998), *Przemysł Spożywczy*, 52, 13-15.
59. Crittenden R. G., Playne M. J., (1996), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 353-361.
60. Sako T., Matsumoto K., Tanaka R., (1999), *Int. Dairy J.*, 9, 69-80.
61. Demczuk A., Bednarski W., Kowalewska-Piontas J., (2004), *Biotechnologia* 3, 66, 152-165.
62. Lopez Leiva M. H., Guzman M., (1995), *Proc. Biochem.*, 30, 757-762.
63. Reuter S., Rusborg Nygaard A., Zimmermann W., (1999), *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 509-516.
64. Shin H.-J., Park J.-M., Yang J.-W., (1998), *Proc. Biochem.*, 33, 787-792.
65. [www.fda.gov](http://www.fda.gov)