

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Zastosowanie termostabilnej rekombinantowej β -galaktozydazy
z *Pyrococcus woesei* do katalizowania reakcji transglikozylacji,
na przykładzie syntezy prebiotycznych oligosacharydów:
laktulozy i *trans*-galaktooligosacharydów**

Katarzyna Sabisz

Promotor: prof. dr hab. Józef Synowiecki

Gdańsk 2011

Michałowi...

*Z serca dziękuję wszystkim osobom,
na których pomoc i życzliwość
mogłam liczyć w trakcie realizacji pracy doktorskiej.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	7
STRESZCZENIE.....	8
CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	10
1. Żywność funkcjonalna.....	10
1.1. Probiotyki.....	11
1.2. Prebiotyki.....	13
1.2.1. <i>trans</i> -Galaktooligosacharydy.....	16
1.2.2. Laktuloza.....	16
2. Enzymatyczna synteza oligosacharydów.....	18
2.1. Wstęp.....	18
2.2. Enzymy katalizujące tworzenie wiązań glikozydowych <i>in vitro</i>	19
2.2.1. Transferazy glikozylowe.....	19
2.2.2. Hydrolazy glikozydowe.....	21
2.2.2.1. Wpływ wybranych czynników na reakcje odwrotnej hydrolizy i transglikozylacji.....	22
2.2.2.2. Zastosowanie termofilnych glikozydaz w syntezie glikozydów i oligosacharydów.....	28
2.2.3. Glikosyntazy.....	29
2.2.4. Transglikozydazy.....	30
3. Zastosowanie immobilizowanych enzymów i komórek drobnoustrojów w biosyntezie.....	31
3.1. Immobilizowane enzymy.....	31
3.2. Wolne komórki.....	38
3.3. Immobilizowane komórki.....	38
3.4. Permeabilizacja komórek.....	41
CEL PRACY.....	42
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	43
4. Materiały i metody.....	43
4.1. Szczepy mikrobiologiczne, podstawowe materiały i odczynniki.....	43
4.2. Aparatura.....	44
4.3. Postępowanie doświadczalne.....	44
4.3.1. Przygotowanie komórek <i>Escherichia coli</i> i <i>Pichia pastoris</i>	44
4.3.2. Izolacja i oczyszczanie termofilnej β -galaktozydazy.....	45
4.3.3. Permeabilizacja komórek <i>E. coli</i> i <i>P. pastoris</i> oraz określanie zmian przepuszczalności błon komórkowych.....	45

4.3.4. Immobilizacja preparatu β -galaktozydazy z <i>P. woesei</i> oraz komórek rekombinowanej <i>E. coli</i>	47
4.3.4.1. Pułapkowanie enzymu lub komórek w alginianie wapnia	47
4.3.4.2. Optymalizacja warunków unieruchamiania enzymu oraz komórek.....	47
4.3.4.3. Modyfikacje alginianowego nośnika enzymu lub komórek.....	47
4.3.5. Oznaczenie aktywności β -galaktozydazy wykazywanej przez różne formy Pw β gal	48
4.3.6. Porównanie właściwości różnych form Pw β gal	49
4.3.6.1. Wpływ temperatury i pH środowiska na aktywność β -galaktozydazy wykazywaną przez różne formy Pw β gal	49
4.3.6.2. Termostabilność biokatalizatorów.....	50
4.3.6.3. Oznaczenie ilości białka uwalnianego przez komórki <i>E. coli</i> i <i>P. pastoris</i> do środowiska	50
4.3.6.4. Analiza elektroforetyczna białek	51
4.3.7. Zastosowanie rekombinantowej β -galaktozydazy z <i>P. woesei</i> do katalizowania reakcji transglikozylacji	52
4.3.7.1. Wykorzystanie różnych akceptorów reszty galaktozy w reakcji transglikozylacji	52
4.3.7.2. Synteza laktulozy.....	52
4.3.7.3. Wielokrotne wykorzystanie pojedynczej porcji biokatalizatora do otrzymywania laktulozy	52
4.3.7.4. Otrzymywanie <i>trans</i> -galaktooligosacharydów i laktulozy z serwatki	53
4.3.7.5. Hydroliza laktozy katalizowana przez Pw β gal	53
4.3.7.6. Synteza laktulozy w reaktorze kolumnowym.....	53
4.3.7.7. Synteza laktulozy w reaktorze barbożowym	54
4.3.8. Analiza jakościowa i ilościowa produktów reakcji enzymatycznych	55
4.3.8.1. Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej	55
4.3.8.2. Analiza produktów reakcji metodą HPLC.....	55
4.3.8.3. Analiza produktów reakcji metodą TLC	55
4.3.9. Obliczanie zawartości tGOS i pozostałości laktozy w mieszaninach po reakcji	56
5. Rezultaty.....	57
5.1. Oczyszczanie termofilnej Pw β gal.....	57
5.2. Zastosowanie Pw β gal do katalizowania reakcji odwrotnej hydrolizy i transglikozylacji. Wybór odpowiedniego akceptora reszty glikozylowej.....	57
5.3. Immobilizacja rekombinantowej β -galaktozydazy z <i>P. woesei</i>	58
5.3.1. Wprowadzenie	58
5.3.2. Permeabilizacja komórek rekombinowanej <i>E. coli</i>	59
5.3.3. Wybór nośnika i optymalizacja warunków unieruchamiania Pw β gal i komórek <i>E. coli</i>	61

5.3.4. Porównanie aktywności hydrolitycznej wolnych i unieruchomionych biokatalizatorów.....	62
5.4. Synteza laktulozy katalizowana przez wolną i unieruchomioną Pwβgal	64
5.4.1. Optymalizacja warunków syntezy laktulozy	64
5.4.2. Wielokrotne wykorzystanie pojedynczej porcji biokatalizatora w oddzielnych reakcjach syntezy laktulozy	69
5.4.3. Wpływ modyfikacji składu złoża alginianowego na jego trwałość	70
5.4.4. Porównanie aktywności hydrolitycznej względem laktozy oraz termostabilności Pwβgal podczyszczonej lub mikrokapsułkowanej w komórkach <i>E. coli</i>	71
5.4.5. Porównanie różnych form Pwβgal pod względem wydajności syntezy laktulozy.....	73
5.4.6. Synteza laktulozy w reaktorze kolumnowym wypełnionym immobilizowanymi w alginianie wapnia komórkami <i>E. coli</i> z Pwβgal.....	74
5.4.7. Synteza laktulozy w reaktorze barbotażowym ze złożem fluidalnym w postaci immobilizowanych w alginianie wapnia komórek <i>E. coli</i> z Pwβgal	76
5.4.8. Podsumowanie	77
5.5. Charakterystyka Pwβgal mikrokapsułkowanej w komórkach <i>Pichia pastoris</i>	79
5.6. Zastosowanie różnych form Pwβgal do syntezy tGOS z laktozy	81
5.7. Zastosowanie różnych form Pwβgal do syntezy laktulozy i tGOS z serwatki	82
WNIOSKI I PERSPEKTYWY	84
WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO	87
LITERATURA.....	88

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Pw β gal - rekombinantowa β -galaktozydaza z *Pyrococcus woesei*

Fru - fruktoza

Gal - galaktoza

Glc - glukoza

Lac - laktoza

Lu - laktuloza

tGOS - *trans*-galaktooligosacharydy

DP - (ang. degree of polymerization) stopień polimeryzacji

EFSA - (ang. European Food Safety Authority) Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności

HPLC - (ang. high-performance liquid chromatography) wysokosprawna chromatografia cieczowa

NPN - 1-N-fenylonaftyloamina

oNP β Gal - *o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozyd

PI - jodek propidyny

SCFA - (ang. short-chain fatty acids) krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

TLC - (ang. thin layer chromatography) chromatografia cienkowarstwowa

STRESZCZENIE

Glikozydazy stosowane są jako katalizatory hydrolytycznego rozkładu różnorodnych wiązań glikozydowych. Niektóre spośród nich wykazują również zdolność do syntetyzowania oligosacharydów w reakcji odwrotnej hydrolyzy lub transglikozytacji. Właściwość ta może być wykorzystywana m.in. do otrzymywania prebiotycznych sacharydów, będących cennymi dodatkami do żywności funkcjonalnej.

Szczególnie przydatnymi katalizatorami odwrotnej hydrolyzy lub transglikozytacji są enzymy termostabilne, które pozwalają na prowadzenie procesu w podwyższonej temperaturze, zwiększającej rozpuszczalność substratów w środowisku reakcji i sprzyjającej tworzeniu wiązań glikozydowych. Do tej grupy należy rekombinantowa β -galaktozydaza z *Pyrococcus woesei* (Pw β gal). Zbadanie możliwości jej zastosowania jako katalizatora syntezy oligosacharydów było przedmiotem niniejszej pracy.

We wstępnych eksperymentach wykazano, że Pw β gal nie katalizowała reakcji odwrotnej hydrolyzy, natomiast przejawiała wysoką aktywność transglikozylacyjną. Jako reakcję modelową służącą do scharakteryzowania tej aktywności przyjęto syntezę laktulozy z laktozy i fruktozy. W badaniach stosowano preparat podczyszczonej Pw β gal (4000 U/g), enzym mikroapsułkowany w komórkach *Escherichia coli* (100 U/g), a także podczyszczony enzym lub komórki *E. coli* z Pw β gal pułapkowane w żelu alginianu wapnia (odpowiednio 3,6 i 3,7 U/g). W temperaturze odpowiedniej dla Pw β gal (powyżej 70°C), komórki *E. coli* szybko traciły aktywność metaboliczną, a integralność ich błony cytoplazmatycznej, ściany komórkowej oraz błony zewnętrznej ulegała naruszeniu, dlatego dodatkowa chemiczna permeabilizacja komórek okazała się niekonieczna. Przy równoważnej zawartości biokatalizatorów w medium reakcyjnym, w obecności wolnych lub unieruchomionych komórek *E. coli* z Pw β gal synteza laktulozy zachodziła wydajniej, niż przy udziale wolnego/immobilizowanego podczyszczonego enzymu. Przyczyną tego był około 80% wzrost aktywności β -galaktozydazy wykazywanej przez komórki (ze 100 do 180 U/g wilgotnej biomasy), spowodowany przypuszczalnie zmianami konformacyjnymi enzymu podczas ogrzewania. Pomimo uwzględnienia wzrostu aktywności Pw β gal w komórkach, w jednakowych warunkach reakcji (10% w/v laktozy, 10% w/v fruktozy, 1,0 U/cm³, 8 godz, 80°C, pH 5,4) wolne oraz immobilizowane w alginianie wapnia bakterie *E. coli* z Pw β gal produkowały laktulozę najbardziej efektywnie (odpowiednio 2,0 i 2,3 g/dm³ substratu/godz). Za sprawą tych dwóch biokatalizatorów uzyskano również najwięcej *trans*-galaktooligosacharydów (odpowiednio 7,1 i 9,1 g/dm³ substratu/godz; 15% w/v laktozy, 1,0 U/cm³, 8 godz, 80°C, pH 5,4).

Preparat immobilizowanych bakterii zastosowano następnie jako upakowane wypełnienie reaktora kolumnowego działającego w systemie okresowym z całkowitą recyrkulacją substratu przez biokatalizator oraz jako złożę fluidalne w pracującym w trybie okresowym reaktorze barbotażowym. Produktywności procesu uzyskane w tych układach (odpowiednio 1,8 oraz 2,3 g/dm³ substratu/godz;

10% w/v laktozy, 10% w/v fruktozy, 8 godz, pH 5,4, 80 oraz 60°C) nie były jednak wyższe od produktywności osiąganych we wcześniejszych reakcjach.

Prowadzone badania ujawniły dodatkowo wady złoża alginianowego: niedostateczną trwałość w temperaturze procesu, której nie poprawiły modyfikacje składu nośnika (zwiększenie stężenia żelu, dodatek żelu krzemionkowego lub tlenku glinu, dodatek chitozanu lub pokrycie granul warstewką chitozanu), a także rozcieńczanie medium reakcyjnego wodą zamkniętą w porach żelu, obniżające wydajność syntezy oraz utrudniające zwiększenie zawartości biokatalizatora w środowisku reakcji. Powyższe względy sprawiły, że za dogodniejszy, bardziej uniwersalny, a przy tym skuteczny i najmniej kosztowny biokatalizator uznano wolne komórki *E. coli* z Pwβgal.

Potencjał katalityczny Pwβgal zamkniętej w komórkach *E. coli* porównano następnie z właściwościami tego enzymu mikrokapsułkowanego w komórkach rekombinowanych drożdży *Pichia pastoris*. Drożdże wykazywały niższą aktywność β-galaktozydazy (20 U/g i 35 U/g po działaniu podwyższonej temperatury), a także mniej efektywnie katalizowały syntezę laktulozy oraz tGOS (odpowiednio 1,9 i 5,9 g/dm³ substratu/godz). Z drugiej strony, drożdże *P. pastoris*, w przeciwieństwie do bakterii *E. coli*, posiadają rekomendację Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) jako gatunek mogący służyć do produkcji rekombinantowych enzymów wykorzystywanych w przetwórstwie spożywczym. Z tej przyczyny oraz ze względu na niski koszt, łatwość oddzielenia od mieszaniny poreakcyjnej, pełną biodegradowalność i stosunkowo dobre właściwości katalityczne, rekombinantowa β-galaktozydaza z *P. woesei* mikrokapsułkowana w komórkach *P. pastoris* może stanowić atrakcyjny biokatalizator w przemysłowej syntezie laktulozy i tGOS.

Praca współfinansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na naukę w latach 2010/2011 jako projekt badawczy nr 2555/B/P01/2010/38.

Praca współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Projekt systemowy Województwa Pomorskiego pn. "InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów, II edycja".



CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Żywność funkcjonalna

Dynamiczny rozwój nauk o żywności i żywieniu, coraz pełniejsze zrozumienie relacji pomiędzy odżywianiem a kondycją organizmu ludzkiego oraz postęp technologiczny dały podstawy do stworzenia koncepcji żywności funkcjonalnej [Roberfroid, 2002]. Ze względu na różnice legislacyjne oraz bogactwo produktów zaliczanych do funkcjonalnych, dotychczas nie opracowano spójnej i powszechnie akceptowanej definicji tego pojęcia [American Dietetic Association, 2009]. Przyjmuje się jednak, że żywność funkcjonalna powinna [Roberfroid, 2002]:

- stanowić zwyczajne, codzienne pożywienie (nie może być tabletką, kapsułką itp.),
- być przyjmowana jako część typowej diety,
- składać się z substancji naturalnych (nie syntetycznych), które mogą jednak występować w wyższych, niż naturalne, stężeniach lub pojawiać się w produktach, w których normalnie nie są obecne,
- wywierać korzystny wpływ na określone funkcje organizmu, poza dostarczaniem substancji odżywczych,
- poprawiać samopoczucie oraz zdrowie i/lub zmniejszać ryzyko wystąpienia chorób, a tym samym polepszać jakość życia,
- wykazywać prozdrowotne działanie będąc spożywaną w ilościach typowych dla przeciętnej diety.

Muszą przy tym istnieć silne naukowe dowody potwierdzające jej korzystne oddziaływanie na organizm człowieka. Zgodnie z powyższymi kryteriami można wyróżnić następujące rodzaje żywności funkcjonalnej (Roberfroid, 2002):

- żywność tradycyjna (np. czosnek, brokuły, pomidory, orzechy, kasze, tłuste ryby morskie...),
- żywność, do której dodano wybrany składnik lub składniki (np. fermentowane napoje mleczne z pro- i/lub prebiotykami, soki owocowe z wapniem, napoje z ekstraktem z żeń-szenia, guarany, margaryny z roślinnymi stanolami, jajka wzbogacone w witaminy i kwasy tłuszczowe *n-3*...),
- żywność, z której usunięto niepożądany składnik (np. produkty pozbawione fenyloalaniny przeznaczone dla osób chorych na fenyloketonurię, kawa bezkofeinowa, jajka niskocholesterolowe...),
- żywność, w której ilość lub właściwości wybranego składnika/składników zostały zmodyfikowane (np. mleko o obniżonej zawartości laktozy),
- żywność, w której biodostępność wybranego składnika/składników została zmodyfikowana (np. polepszona przyswajalność wapnia dzięki dodatkowi inuliny),
- żywność, którą poddano kilku wymienionym operacjom.

Należy również podkreślić, że każda żywność jest w pewnym fizjologicznym sensie funkcjonalna, ponieważ dostarcza organizmowi substancje odżywcze niezbędne do rozwoju i podtrzymania procesów życiowych. Produkty zaliczane do funkcjonalnych mogą powodować dodatkowe prozdrowotne efekty pod warunkiem, że są spożywane jako część różnorodnej diety [American Dietetic Association, 2009].

Największy udział w światowym rynku żywności funkcjonalnej mają USA i Japonia, ale przewiduje się wzrost zysków ze sprzedaży produktów prozdrowotnych w krajach Europy Zachodniej oraz na Węgrzech, w Polsce i w Rosji [Siró i wsp., 2008]. Jak dowodzą analizy prowadzone w minionych latach (Tabela 1.1.), globalny rynek żywności funkcjonalnej w najbliższej przyszłości będzie się dynamicznie rozwijał by, według prognoz, w roku 2010 osiągnąć wartość około 53 mld USD [Euromonitor International, 2006]. Zmiany stylu życia, wzrost kosztów opieki zdrowotnej, wzrost świadomości konsumentów odnośnie oddziaływania żywności na zdrowie i samopoczucie oraz przyczyn występowania chorób żywieniowo zależnych, a także nowe osiągnięcia naukowe i technologiczne będą sprzyjać tej tendencji [Menrad, 2003; Roberfroid, 2002; Siró i wsp., 2008].

1.1. Probiotyki

Najpopularniejszą i najczęściej kojarzoną z prozdrowotnym działaniem grupę produktów stanowią artykuły wzbogacone w kultury drobnoustrojów probiotycznych [Menrad, 2003; Siró i wsp., 2008]. Typowym nośnikiem tych mikroorganizmów jest nabiał, szczególnie fermentowane napoje mleczne, ale dodawane mogą być także do lodów [Cruz i wsp., 2009], soków owocowych, przetworów zbożowych oraz mięsa [Rivera-Espinoza i Gallardo-Navarro, 2010; Siró i wsp., 2008]. Przyjmowanie probiotyków z pożywieniem ma na celu poprawę funkcjonowania przewodu pokarmowego poprzez zwiększenie udziału szczepów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* we florze jelitowej [Fooks i wsp., 1999; Rastall i wsp., 2000]. Równowaga mikrobiologiczna tego organu ma bowiem szczególne znaczenie dla zdrowia całego organizmu [Bäckhead i wsp., 2005; Macfarlane i Macfarlane, 2004; Wells i wsp., 2008].

Mianem probiotyków określa się wyselekcjonowane mikroorganizmy, które spożyte w stanie żywym, w odpowiednio dużej ilości, są zdolne przetrwać pasaż jelitowy i wywrzeć korzystny wpływ na zdrowie człowieka [FAO/WHO, 2002; Woźniak-Kosek i Jarosz, 2005a]. Część szczepów probiotycznych stanowią drobnoustroje wyizolowane z przewodów pokarmowych zdrowych ludzi, inne pochodzą z fermentowanych produktów mlecznych. Najczęściej stosowane probiotyki to bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz drożdże (Tabela 1.2.). Istnieją również doniesienia na temat probiotycznego potencjału niektórych szczepów *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium freudenreichii* [Ouwehand i wsp., 2002; Prado i wsp., 2008], *Clostridium botyricum*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* sp.*dextranicum* oraz

Pediococcus acidilactici [Prado i wsp., 2008]. Jak dowodzą prowadzone badania, aktywność probiotyczna jest specyficzna dla danego szczepu i, w obrębie tego samego gatunku, jedne szczepy mogą wywoływać określony korzystny efekt w organizmie gospodarza, podczas gdy inne nie [Mattila-Sandholm i wsp., 1999; Weichselbaum, 2009].

Prozdrowotne działanie probiotyków wynika z możliwości zwykle przejściowej i odwracalnej kolonizacji jelita grubego przez te mikroorganizmy [Weichselbaum, 2009; Woźniak-Kosek i Jarosz, 2005a], na co wpływa ich zdolność do przetrwania kontaktu z kwasem solnym w żołądku, solami żółciowymi i sokiem trzustkowym oraz do adhezji do nabłonka jelita [Woźniak-Kosek i Jarosz, 2005a]. W jelicie probiotyki zwiększają swą liczebność. W wyniku fermentacji nieprzyswojonych przez człowieka składników pokarmowych wytwarzają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), głównie kwas octowy, propionowy oraz masłowy, które w większości są wchłaniane i stanowią źródło energii dla komórek gospodarza, ale także obniżają pH w świetle jelita, polepszają absorpcję wapnia, magnezu i żelaza, usprawniają wydalanie szkodliwych produktów fermentacji białek i peptydów (m.in. amoniaku i amin). Dodatkowo probiotyki mogą wydzielać substancje o właściwościach bakteriobójczych (np. bakteriocyny, H₂O₂). Probiotyki hamują rozwój bakterii patogennych oraz ograniczają ich przywieranie do nabłonka jelita [Fooks i wsp., 1999; Ng i wsp., 2009; Wells i wsp., 2008], ograniczają też procesy gnilne i pobudzają motorykę jelit [Fooks i wsp., 1999; Woźniak-Kosek i Jarosz, 2005b]. Ponadto probiotyki powodują zwiększenie wydzielania śluzu w jelitach oraz wzmacniają właściwości barierowe śluzówki i nabłonka jelitowego [Fooks i wsp., 1999; Ng i wsp., 2009; Wells i wsp., 2008]. Aktywują także układ odpornościowy gospodarza, m.in. poprzez bezpośrednie oddziaływania z komórkami tkanki limfatycznej związanej z błonami śluzowymi jelit [ang. gut-associated lymphoid tissue, GALT] oraz komórkami nabłonka [Borchers i wsp., 2009; Vos i wsp., 2007; Wells i wsp., 2008], jak również za pośrednictwem SCFA i innych metabolitów, np. peptydów [Seifert i Watzl, 2008; Vos i wsp., 2007].

Dotychczas ukazało się wiele prac przeglądowych podsumowujących współczesną wiedzę na temat potencjalnego dobroczynnego wpływu probiotyków na zdrowie człowieka [Borchers i wsp., 2009; Lenoir-Wijnkoop i wsp., 2007; Lovegrove i Jackson, 2000; Mattila-Sandholm i wsp., 1999; Mottet i Michetti, 2005; Ouwehand i wsp., 2002; Rastall i wsp., 2000; Salminen i Gueimonde, 2005; Weichselbaum, 2009; Woźniak-Kosek i Jarosz, 2005b]. Stosunkowo dobrze udokumentowana jest efektywność niektórych szczepów probiotycznych w łagodzeniu objawów nietolerancji laktozy, zespołu jelita drażliwego, we wspomaganiu leczenia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, zapalenia błony śluzowej zbiornika jelitowego, zapaść, w zapobieganiu biegunce poantybiotykowej i skracaniu czasu trwania ostrej biegunki [Mottet i Michetti, 2005; Ouwehand i wsp., 2002; Salminen i Gueimonde, 2005; Weichselbaum, 2009; Woźniak-Kosek i Jarosz, 2005b]. Wszyscy autorzy podkreślają jednak

konieczność prowadzenia dalszych badań, mających na celu weryfikację postulowanej skuteczności probiotyków zarówno w wymienionych, jak i wielu innych przypadkach.

Ponieważ fermentacja mlekowa od wieków wykorzystywana była przez ludzi do utrwalania, polepszania jakości oraz modyfikowania właściwości organoleptycznych żywności, do niedawna powszechne było przekonanie o bezpieczeństwie zdrowotnym probiotyków. W ostatnich latach obawy klinicyстів zaczęła jednak budzić: możliwość przekazywania przez probiotyki genów odporności na antybiotyki mikroorganizmom chorobotwórczym [Liong, 2008; Mathur i Singh, 2005], stosowanie jako probiotyków bakterii z rodzajów *Streptococcus*, *Bacillus* i *Enterococcus*, do których należy wiele gatunków patogennych, oraz odnotowywane niekiedy przypadki izolowania szczepów probiotycznych, także tych przyjętych z pożywieniem, z różnego typu zakażeń, m.in. infekcji miejscowych, infekcji krwiobiegu, bakteriemii, zapalenia wsierdza [Boyle i wsp., 2006; Ishibashi i Yamazaki, 2001]. Wirulencja probiotyków jest w znacznym stopniu determinowana przez ich zdolność do adhezji na śluzówce jelita oraz do translokacji, czyli przenikania w głąb organizmu gospodarza przez nieprawidłowo funkcjonującą barierę błony śluzowej i nabłonka jelit [Boyle i wsp., 2006; Ishibashi i Yamazaki, 2001; Liong, 2008]. Należy jednak podkreślić, że wspomniane infekcje diagnozowano tylko u wcześniaków, pacjentów osłabionych, przewlekle chorych, z niedoborem odporności, po wycieńczających kuracjach itd.. Nie istnieją natomiast doniesienia o występowaniu podobnych problemów u osób ogólnie zdrowych [Boyle i wsp., 2006; Ishibashi i Yamazaki, 2001; Liong, 2008].

Obok wciąż nierozstrzygniętej kwestii bezpieczeństwa zdrowotnego probiotyków, kolejną trudność stwarza ich stosowanie w produkcji artykułów żywnościowych. Ogromna ilość komórek bakteryjnych jest tracona w toku procesu technologicznego oraz podczas przechowywania w warunkach niskiego pH. Częściowo można temu przeciwdziałać stosując rozmaite metody mikrokapsułkowania komórek probiotyków [Anal i Singh, 2007]. Dodatkowo produkty mleczne fermentowane z udziałem probiotyków mają, w porównaniu z tradycyjnymi, nieco inny smak oraz specyficzny aromat, które to cechy nie zawsze są pożądane i akceptowane przez konsumentów [Krajewska-Kamińska i wsp., 2007].

Biorąc pod uwagę powyższe, modulacja mikroflory jelitowej za pomocą prebiotyków wydaje się być mniej kontrowersyjnym, a jednocześnie równie efektywnym i bardzo naturalnym rozwiązaniem, ponieważ pierwszymi prebiotykami, które człowiek przyjmuje z pokarmem już w niemowlęctwie, są oligosacharydy zawarte w mleku kobiecym [Coppa i wsp., 2004].

1.2. Prebiotyki

Początkowo prebiotyki definiowano jako „niestrawne składniki pożywienia wywierające korzystny wpływ na organizm gospodarza poprzez selektywne stymulowanie wzrostu i/lub aktywności

bakterii jelitowych jednego lub ograniczonej liczby gatunków, prowadzące do polepszenia zdrowia gospodarza” [Gibson i Roberfroid, 1995]. Aktualnie tym mianem określa się „substancje, których selektywna fermentacja prowadzi do specyficznych zmian w składzie i/lub aktywności mikroflory przewodu pokarmowego, oddziałującej korzystnie na dobre samopoczucie i zdrowie gospodarza” [Gibson i wsp., 2004]. Prebiotyk zatem musi być odporny na procesy trawienne (działanie kwasu solnego w żołądku, hydrolizę enzymatyczną) oraz wchłanianie zachodzące w górnym odcinku układu pokarmowego ssaków, ulegać fermentacji pod wpływem mikroflory jelitowej oraz pobudzać wzrost i/lub aktywność tych spośród drobnoustrojów naturalnie zasiedlających różne rejony przewodu pokarmowego, które pozytywnie oddziałują na zdrowie i samopoczucie gospodarza (w szczególności probiotyków z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*) [Roberfroid, 2008].

Właściwości prebiotyczne mogą posiadać niektóre peptydy, białka i lipidy, jednak największe zainteresowanie środowisk naukowych oraz przemysłu (m.in. spożywczego, farmaceutycznego, kosmetycznego) zyskały niestrawne węglowodany [Swennen i wsp., 2006]. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, tylko inulina, fruktooligosacharydy, laktuloza i *trans*-galaktooligosacharydy spełniają wymogi stawiane prebiotykom [Kolida i Gobson, 2008; Gibson i wsp., 2004; Roberfroid, 2008]. Wkrótce do tej grupy mogą zostać zaliczone także izomaltooligosacharydy, ksylooligosacharydy, glukooligosacharydy zawierające w strukturze wiązania $\alpha(1\rightarrow2)$, oligosacharydy nasion soi oraz laktosacharoza [Gibson i wsp., 2004; Roberfroid, 2008]. Istnieją również mniej liczne doniesienia na temat prebiotycznego potencjału oligodekstranów, polidekstrozy, skrobi odpornej i jej pochodnych, gentoooligosacharydów, oligosacharydów mannanów i pektyn, N-acetylochitoooligosacharydów, alkoholi cukrowych [Roberfroid, 2007, 2008], laktozy [Szilagy, 2002, 2004], panozy [Mäkeläinen i wsp., 2009] oraz galaktozylosorbitolu [Klewicki, 2010].

Mechanizmy, za pośrednictwem których prebiotyki wywierają pożądany wpływ na organizm konsumenta, nie zostały dotąd w pełni poznane [Seifert i Watzl, 2008; Vos i wsp., 2007]. Z jednej strony prebiotyki, indukując zmiany w składzie i/lub aktywności metabolicznej bakterii komensalnych naturalnie bytujących w układzie trawiennym (m.in. zwiększenie populacji gatunków z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, intensyfikacja produkcji i modyfikacja profilu SCFA), uruchamiają szereg interakcji mikroflora-gospodarz, opisanych w poprzednim podrozdziale. Z drugiej, ich funkcjonowanie może być niezależne od efektu prebiotycznego. Przypuszcza się, że prebiotyki jak również inne oligosacharydy, są częściowo absorbowane w przewodzie pokarmowym w niezmienionej postaci, co może prowadzić do ich bezpośredniego kontaktu, miejscowego oraz ogólnoustrojowego, z komórkami układu odpornościowego organizmu i wywoływać efekt immunomodulacyjny [Seifert i Watzl, 2008; Vos i wsp., 2007]. Zgodne z tą hipotezą są rezultaty badań, w których *in vitro* analizowano transport przez nabłonek oraz odpowiedź immunologiczną indukowaną m.in. przez kwaśne oligosacharydy mleka kobiecego

lub mieszaninę krótkołańcuchowych β -galaktooligosacharydów i długołańcuchowych β -fruktooligosacharydów (9:1), dobranych tak, by pod względem profilu mas cząsteczkowych przypominały frakcję neutralnych oligosacharydów mleka kobyliczego [Eiwegger i wsp., 2010].

Prebiotyki, nie tylko ze względu na działanie prozdrowotne, ale również z przyczyn technologicznych stanowią cenny dodatek do żywności oraz odżywek dla niemowląt [Crittenden i Playne, 1996; Fanaro i wsp., 2005; Franck, 2008; Vandenplas, 2008; Wang, 2009]. Ponadto, ich bezpieczeństwo zdrowotne nie budzi zastrzeżeń [Pascal, 2008]. Prebiotyczne oligosacharydy są substancjami dobrze rozpuszczalnymi w wodzie. Odnaczają się czystym, neutralnym zapachem i smakiem, co razem z niską słodkością (wyjątkiem jest laktuloza wykazująca 60-80% słodkości sacharozy [Schumann, 2002]) sprawia, że stanowią znakomity wypełniacz różnorodnych produktów, a w połączeniu z silnie słodzącymi substancjami także substytut cukru. Oligosacharydy dobrze harmonizują z delikatnymi aromatami żywności, często wzmacniają aromaty owocowe [Franck, 2008]. Podobnie jak inne sacharydy, wykazują działanie krioprotekcyjne, zatrzymują wilgoć w produktach, przeciwdziałając ich wysychaniu, oraz zapobiegają zanieczyszczeniom mikrobiologicznym poprzez obniżanie aktywności wody w żywności [Crittenden i Playne, 1996; Franck, 2008]. Z kolei inulina, dzięki niskiej rozpuszczalności w wodzie, znajduje dodatkowo zastosowanie jako zamiennik tłuszczu, stabilizator pian i emulsji, a także, w odpowiednio wysokim stężeniu, czynnik żelujący działający synergistycznie z innymi substancjami tworzącymi żele [Franck, 2008]. Inulina oraz prebiotyczne oligosacharydy znacząco poprawiają właściwości organoleptyczne żywności. Ponieważ prebiotyki nie ulegają trawieniu ani wchłanianiu w górnej części układu pokarmowego, a ich wartość energetyczna wynosi około 2 kcal/g [Franck, 2008], mogą wchodzić w skład produktów o obniżonej kaloryczności, pomocnych w walce z nadwagą i otyłością. Prebiotyki zachowują stabilność podczas procesu produkcyjnego, a ich stosowanie nie sprawia trudności technologicznych. Mogą także być dodawane do znacznie szerszej, w porównaniu z probiotykami, gamy produktów, na przykład: artykułów mleczarskich, mrożonych deserów, przetworów owocowych, cukierków, czekolady, ciast i ciastek, pieczywa, płatków i przekąsek zbożowych, margaryn, gotowych sosów i dresingów, a także wędlin i pasztetów [Franck, 2008]. Niekiedy możliwe jest również łączne stosowanie pre- i probiotyków. Artykuły tego typu noszą nazwę synbiotyków [Gibson i Roberfroid, 1995]. W takich układach prebiotyki zwiększają przeżywalność probiotyków w procesie technologicznym i podczas wędrówki przez przewód pokarmowy konsumenta, oraz ułatwiają zasiedlenie przez probiotyki jelita grubego [Rastall i wsp., 2000].

Odkąd w 2006 roku w krajach Unii Europejskiej zakazano stosowania antybiotyków w celu stymulowania wzrostu zwierząt hodowlanych, prebiotyki wraz z probiotykami zyskały zainteresowanie jako ich potencjalne zamienniki. W rezultacie pre- i/lub probiotyki coraz częściej stanowią dodatki do pasz dla drobiu, trzody chlewnej i młodego bydła, mające polepszyć przyswajalność pokarmu,

zwiększyć przyrost masy zwierząt i wzmocnić naturalne mechanizmy obrony przed patogenami, a w przypadku karm dla psów, kotów i koni- poprawiać ogólny stan zdrowia i zapobiegać chorobom [Gaggia i wsp., 2010; Van Loo i Vancraeynest, 2008].

1.2.1. *trans*-Galaktooligosacharydy

trans-Galaktooligosacharydy (tGOS) stanowią mieszaninę oligosacharydów o stopniu polimeryzacji (DP) od 2 do 8, przy czym średnia wartość DP wynosi 3 [Franck, 2008]. Zbudowane są z laktozowego rdzenia, do którego od strony nieredukującej za pośrednictwem wiązania $\beta(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow3)$ lub $\beta(1\rightarrow4)$ przyłączona została co najmniej jedna podjednostka galaktozy. W dużym uproszczeniu ich strukturę można przedstawić jako $(Gal)_n-Gal-\beta(1\rightarrow4)-Glc$ [Franck, 2008; Roberfroid, 2008]. tGOS znajdują zastosowanie głównie jako dodatek do żywności funkcjonalnej lub preparatów do żywienia niemowląt. W skali przemysłowej produkowane są z laktozy w reakcji transglikozyzacji katalizowanej przez β -galaktozydazy [Crittenden i Playne, 1996]. Wydajność syntezy oraz struktura chemiczna uzyskiwanych produktów zależą od stosowanego enzymu, stężenia laktozy w medium reakcyjnym oraz warunków reakcji [Franck, 2008]. Wydajność produktu uzyskiwana w tym procesie jest stosunkowo niska [Swennen i wsp., 2006], dlatego wciąż poszukuje się β -galaktozydaz, które prowadziłyby syntezę bardziej efektywnie.

1.2.2. Laktuloza

Laktuloza (4-O- β -D-galaktopiranozylo-D-fruktofuranosa) jest disacharydem niespotykanym w naturze. Ze względu na unikalne właściwości, otrzymuje się ją w ilościach przemysłowych w reakcji transformacji Lobry de Buryn – Alberda van Ekenstein, podczas której w cząsteczce laktozy przy udziale alkalicznego katalizatora następuje izomeryzacja podjednostki glukozy do fruktozy [Aider i de Halleux, 2007]. Proces przebiega w podwyższonej temperaturze (70-100°C). Jako katalizatory zastosowanie znajdują: wodorotlenki sodu, potasu, wapnia lub baru, tlenek magnezu, węglan sodu lub potasu, fosforany, siarczany (IV) oraz aminy trzeciorzędowe, ale dopiero dodatek boranów lub glinianów powoduje zwiększenie wydajności przemiany do około 80% [Aider i de Halleux, 2007; Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010]. Borany i gliniany w środowisku alkalicznym tworzą z laktulozą nierozpuszczalne kompleksy, co skutkuje przesunięciem równowagi izomeryzacji na korzyść produktu oraz zapobiega degradacji laktulozy w reakcjach ubocznych [Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010]. Niedogodności tego procesu wynikają z konieczności stosowania dużych ilości katalizatorów oraz substancji kompleksujących, jak również z trudności z ich oddzieleniem od produktu [Zokaee i wsp., 2002]. Łatwość separacji jest natomiast jedną z zalet katalizatorów heterogenicznych, takich jak zeolity,

sepiolity, skorupy jaj [Montilla i wsp., 2005] lub muszle ostryg [Paseephol i wsp., 2008], które jednak nie znalazły szerokiego praktycznego zastosowania [Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010].

Niezwykle interesującą alternatywę dla metod polegających na dodawaniu zasadowego katalizatora do środowiska reakcji stanowi generowanie warunków alkalicznych *in situ*. Osiąga się to albo w wyniku cyrkulacji roztworu substratu przez złożę jonowymienne, uwalniające aniony wodorotlenowe, albo za sprawą dysocjacji elektrolitycznej wody na jony wodorotlenowy i hydroniowy pod wpływem przykładanego napięcia [Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010]. Wymienione technologie wciąż znajdują się w fazie badań.

Laktuloza może być również wytwarzana w reakcji laktozy z amoniakiem lub aminami I-rzędowymi (tzw. przegrupowanie Amadori), połączonej z hydrolizą powstającego kompleksu. Metoda ta nie zyskała jednak zwolenników [Aider i de Halleux, 2007].

Coraz większe zainteresowanie zdobywa natomiast enzymatyczna synteza laktulozy wykorzystująca aktywność transglikozylacyjną β -galaktozydaz [Olano i Corzo, 2009; Schumann, 2002; Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010]. Reakcja polega na przeniesieniu przez enzym reszty galaktozylowej z cząsteczki laktozy na fruktozę. Przydatność w tym procesie potwierdzono m.in. dla β -galaktozydazy z *Escherichia coli* [Ajisaka i wsp., 1988], *Kluyveromyces lactis* [Lee i wsp., 2004], *Aspergillus niger*, *Pyrococcus furiosus* [Mayer i wsp., 2004], *Sulfolobus solfataricus* [Kim i wsp., 2006] oraz *Sulfolobus acidocaldarius* [Timoharju i wsp., 2009]. Synteza enzymatyczna, w porównaniu z chemiczną, jest mniej wydajną metodą otrzymywania laktulozy. Najwyższy stopień konwersji substratu (laktozy), jaki uzyskano w jej wyniku, wynosił 44% [Mayer i wsp., 2004; Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010]. Z drugiej strony, ogromnymi zaletami tego rozwiązania są mniejsza uciążliwość dla środowiska naturalnego oraz to, że powstające w jego trakcie produkty uboczne, takie jak glukoza, galaktoza, tGOS, izomery laktulozy, jak również pozostałości substratów, nie są niebezpieczne dla zdrowia konsumentów. Co więcej, w razie zastosowania immobilizowanego enzymu możliwe jest kilkakrotne wykorzystanie jednej porcji biokatalizatora w odrębnych szarżach produkcyjnych lub prowadzenie procesu w sposób ciągły.

Omawiany disacharyd w niewielkich ilościach powstaje także na skutek izomeryzacji laktozy zachodzącej podczas termicznej obróbki mleka [Olano i Corzo, 2009; Schumann, 2002; Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010]. Zawartość laktulozy może być zatem wykorzystywana jako parametr świadczący o ilości i przebiegu operacji termicznych, którym poddano mleko [Olano i Corzo, 2009].

Laktuloza, zgodnie z klasyfikacją World Health Organization, jest lekiem działającym łagodnie przeczyszczająco, stosowanym głównie w terapii przewlekłych zaparć [Schumann, 2002; Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010]. Potencjał leczniczy laktulozy wynika z jej aktywności prebiotycznej. Produkty fermentacji tego disacharydu, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, zwiększają ciśnienie

osmotyczne w jelicie oraz ograniczają absorpcję wody z treści pokarmowej, powodując rozluźnienie stolca. Wspomagają ponadto leczenie encefalopatii wątrobowej, ponieważ dzięki zakwaszaniu treści jelita, przekształcają amoniak w kation amonowy, który jest z łatwością wydalany z organizmu [Schumann, 2002; Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010]. W mniejszych dawkach laktuloza mogłaby być dodawana do artykułów żywnościowych jako składnik funkcjonalny [Olano i Corzo, 2009], jednak pomimo działania prebiotycznego, korzystnych właściwości technologicznych oraz bezpieczeństwa zdrowotnego, tylko w Japonii została dopuszczona do stosowania w żywności. W Europie możliwość nadania laktulozie statusu dodatku do żywności jest wciąż rozpatrywana [Schumann, 2002; Schuster-Wolff-Bühning i wsp., 2010].

2. Enzymatyczna synteza oligosacharydów

2.1. Wstęp

Obecnie oligosacharydy najczęściej izoluje się bezpośrednio z surowców naturalnych (na przykład: sacharoza z buraków cukrowych, laktoza z mleka krowiego, oligosacharydy z nasion soi, inulina z korzeni cykorii itd.) lub otrzymuje w wyniku chemicznej, bądź enzymatycznej hydrolizy naturalnych polisacharydów (glukoza, maltoza, maltooligosacharydy, dekstryny ze skrobi, fruktooligosacharydy z inuliny, N-acetylochitooligosacharydy z chityny itd.) [Olesienkiewicz i Grajek, 2005]. Sposoby te zawodzą jednak w przypadku oligosacharydów, których zawartość w surowcu jest niska, a proces pozyskiwania bardzo skomplikowany lub nieopłacalny, ewentualnie surowiec jest trudno albo wręcz niedostępny.

Rozwiązaniem wartym uwagi, szczególnie w odniesieniu do bardzo specyficznych lub niespotykanych w przyrodzie oligosacharydów i ich pochodnych, jest synteza organiczna. Niestety, pomimo niewątpliwego postępu, jaki dokonał się w tej dziedzinie na przestrzeni ostatnich lat [Bartolozzi i Seeberger, 2001; Oscarson, 2009], wciąż pozostaje ona procesem złożonym, obejmującym sekwencję etapów protekcji i deprotekcji grup hydroksylowych sacharydów, aktywacji węgla anomerycznego, izolacji i oczyszczania produktów pośrednich oraz produktu finalnego, wymagającym niejednokrotnie stosowania wyszukanych strategii syntetycznych w celu uzyskania/zachowania pożądanej konformacji powstających wiązań [Oscarson, 2009]. Podejście to jest więc czasochłonne, kosztowne i często mało wydajne [Crout i Vic, 1998; Toone i wsp., 1989].

Otrzymywanie oligosacharydów katalizowane enzymatycznie umożliwia w dużym stopniu kontrolowanie regio- oraz stereoselektywności reakcji [Crout i Vic, 1998; Daines i wsp., 2004; Murata i Usui, 2006; Palcic, 1999; Toone i wsp., 1989; Watt i wsp., 1997]. Synteza enzymatyczna, w porównaniu z chemiczną, jest postępowaniem znacznie mniej skomplikowanym, często jednoetapowym, przebiegającym w łagodniejszych warunkach, niewymagającym wysokiej czystości

substratów i biokatalizatorów, łatwym do realizacji w skali przemysłowej i mniej uciążliwym dla środowiska [Palcic, 1999; Toone i wsp., 1989]. Co więcej, w ostatnich latach metodami inżynierii genetycznej zmieniono specyficzność wielu enzymów względem substratu i/lub katalizowanej reakcji oraz polepszono ich właściwości, a nawet uzyskano szereg nowych biokatalizatorów [Daines i wsp., 2004; Hult i Berglund, 2003; Kittl i Withers, 2010; Wang i Huang, 2009; Williams i wsp., 2008]. Dodatkowe korzyści, takie jak prowadzenie procesu w sposób ciągły lub wielokrotne wykorzystanie jednej porcji biokatalizatora, przynosi stosowanie enzymu immobilizowanego [Guisan, 2006].

Interesującym wariantem enzymatycznej glikozylacji jest mikrobiologiczna synteza oligosacharydów, w której udział biorą zarówno szczepy dzikie, jak i modyfikowane genetycznie [Prapulla i wsp., 2000; Ruffing i Chen, 2006]. W reakcję tą zaangażowana może być aktywność tylko jednego, często rekombinantowego, enzymu obecnego w komórce lub cała „maszyna metaboliczna” danego mikroorganizmu.

Procedurą łączącą zalety zarówno chemicznej, jak i enzymatycznej syntezy glikozydów i oligosacharydów, pozwalającą uzyskać bardzo złożone struktury, zawierające wiele różnorodnych grup funkcjonalnych, jest synteza chemoenzymatyczna. Enzymy często służą do otrzymywania glikozylowanych produktów pośrednich, które na dalszych etapach poddawane są chemicznym modyfikacjom. Pozwala to wyeliminować niektóre etapy syntezy chemicznej i znacząco skrócić czas całego procesu [Akita i wsp., 1999; Vic i wsp., 1996].

Enzymy stanowią zatem znakomite narzędzia do syntezy niejednokrotnie bardzo specyficznych i złożonych glikozydów oraz oligosacharydów.

2.2. Enzymy katalizujące tworzenie wiązań glikozydowych *in vitro*

Enzymatyczna synteza wiązań glikozydowych *in vitro* może odbywać się za pośrednictwem transferaz glikozylowych lub hydrolaz glikozydowych. Do drugiej z wymienionych klas należą kolejne dwa rodzaje katalizatorów przydatnych w tym procesie: transglikozydazy i glikosyntazy (Rysunek 2.1.).

2.2.1. Transferazy glikozyłowe

Transferazy glikozyłowe (EC 2.4.x.y), inaczej glikozylotransferazy, katalizują tworzenie wiązań glikozydowych *in vivo* [Plou i wsp., 2007; Watt i wsp., 1997]. Enzymy te najczęściej związane są z membranami retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego. Ich rola polega głównie na post-translacyjnej modyfikacji peptydów i białek [Olesienkiewicz i Grajek, 2005].

Ze względu na rodzaj wykorzystywanego donora reszty glikozyłowej, wyróżnia się dwa rodzaje glikozylotransferaz: transferazy glikozyłowe typu Leloir'a (ang. Leloir-type glycosyltransferases) i transferazy glikozyłowe inne niż typu Leloir'a (ang. non-Leloir glycosyltransferases) [Plou i wsp., 2007;

Weijers i wsp., 2008; Williams, 2010]. Transferazy typu Leloir'a katalizują przeniesienie reszty glikozylowej ze specyficznego, aktywowanego donora, będącego cukrową pochodną mono- lub difosforanu nukleotydu (u ssaków są to: UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-Xyl, UDP-GlcA, GDP-Man, GDP-Fuc i CMP-NeuAc), na odpowiedni akceptor. Enzymy z drugiej grupy rozpoznają donory takie jak mono- lub difosforany sacharydów oraz glikozylowane mono- lub difosforany izoprenoidowe [Watt i wsp., 1997; Williams, 2010]. Akceptor reszty glikozylowej w obu przypadkach stanowić może grupa hydroksylowa lub aminowa węglowodanu, pochodnej węglowodanu, polipeptydu, białka, kwasu nukleinowego lub lipidu [Olesienkiewicz i Grajek, 2005; Weijers i wsp., 2008]. Glikozylotransferazy wykazują wysoką specyficzność względem katalizowanej reakcji- dana transferaza *in vivo* katalizuje regio- i stereoselektywnie tworzenie wiązania glikozydowego tylko jednego rodzaju [Plou i wsp., 2007]. Transfer reszty glikozylowej może przebiegać z zachowaniem lub odwróceniem konfiguracji węgla anomerycznego uczestniczącego w nowym wiązaniu względem substratu (donora), dlatego rozróżnia się odpowiednio transferazy glikozylowe retencyjne i inwertujące [Weijers i wsp., 2008; Williams, 2010]. Mechanizm działania glikozylotransferaz inwertujących jest analogiczny do mechanizmu inwertujących hydrolaz glikozydowych, natomiast kataliza prowadzona przez retencyjne transferazy glikozylowe nie została dotąd w pełni wyjaśniona [Weijers i wsp., 2008; Kittl i Withers, 2010].

Do syntezy oligosacharydów *in vitro* służą głównie glikozylotransferazy typu Leloir'a, które w tych warunkach tolerują szerszą gamę akceptorów, niż w naturze [Weijers i wsp., 2008]. Do niedawna transferazy glikozylowe nie cieszyły się popularnością ze względu na ich ograniczoną dostępność, niewielką stabilność oraz wymagania co do kosztownych donorów reszt cukrowych [Bucke, 1996; Crout i Vic, 1998; Olesienkiewicz i Grajek, 2005; Watt i wsp., 1997]. Dostępność tych enzymów wciąż pozostaje sporym problemem (tylko 10 handlowych preparatów transferaz glikozylowych [Weijers i wsp., 2008]) pomimo tego, że zidentyfikowano wiele nowych glikozylotransferaz [CAZy Database, 2010; Weijers i wsp., 2008], jak również metodami inżynierii genetycznej uzyskano enzymy o polepszonych właściwościach [Hancock i wsp., 2006; Luzhetskyy i Bechthold, 2008; Williams i wsp., 2008]. Z drugiej strony, wszystkich dziewięć donorów reszt glikozylowych spotykanych u ssaków jest dostępnych komercyjnie w coraz atrakcyjniejszych cenach hurtowych. Zaproponowano też metody ich enzymatycznej regeneracji sprzężonej z syntezą sacharydów katalizowaną przez transferazy glikozylowe. Regeneracja donorów zapobiega dodatkowo inhibicji glikozylotransferaz przez uwalniane w trakcie reakcji fosforany nukleozydów [Murata i Usui, 2006; Olesienkiewicz i Grajek, 2005; Weijers i wsp., 2008]. Błyskotliwym ulepszeniem tego systemu, pozwalającym zasadniczo zredukować koszty syntezy, jest wprowadzenie go metodami inżynierii genetycznej do wnętrza komórki mikroorganizmu [Blanchard i Thorson, 2006; Luzhetskyy i Bechthold, 2008; Ruffing i Chen, 2006]. W wielu przypadkach możliwe jest również wykorzystanie naturalnej „maszyny” enzymatycznej drobnoustroju do resyntezy

aktywowanych donorów [Murata i Usui, 2006; Ruffing i Chen, 2006]. Nie dziwi zatem, że rośnie liczba doniesień literaturowych na temat wykorzystania transferaz glikozylowych w syntezie specyficznych oligosacharydów i glikokoniugatów [na przykład: Koeller i Wong, 2000; Luzhetskyy i wsp., 2008; Murata i Usui, 2006; Palcic, 1999; Qian i wsp., 2002].

2.2.2. Hydrolazy glikozydowe

Hydrolazy glikozydowe (EC 3.2.x.y), inaczej glikozydazy, są enzymami szeroko rozpowszechnionymi w naturze. Występują w komórkach mikroorganizmów, tkankach roślinnych i zwierzęcych [Scigelova i wsp., 1999]. Podstawową reakcją katalizowaną przez te enzymy jest rozszczepienie wiązania glikozydowego zachodzące przy udziale wody. Podobnie jak w przypadku transferaz glikozylowych, glikozydazy podzielić można na enzymy inwertujące i retencyjne [Rye i Withers, 2000; Withers, 2001; Withers i Williams, 2010]. W wyniku hydrolizy wiązania glikozydowego enzymy inwertujące uwalniają produkt o odwrotnej w stosunku do substratu konformacji węgla anomerycznego, natomiast retencyjne produkt o konformacji niezmienionej. U większości glikozydaz w reakcję zaangażowane są łańcuchy boczne pary aminokwasów karboksylowych (kwasu glutaminowego i/lub kwasu asparaginowego), obecnych w centrum katalitycznym [Moracci i wsp., 2001; Withers i Williams, 2010]. Rozszczepienie wiązania glikozydowego katalizowane przez hydrolazy inwertujące jest reakcją jednoetapową, polegającą na bezpośrednim zastąpieniu grupy odchodzącej cząsteczką wody, przy czym jedna z reszt karboksylowych kieszeni katalitycznej działa jako kwas- donor protonu, a druga jako zasada- akceptor protonu (Rysunek 2.2.A.). Reakcja katalizowana przez glikozydazy retencyjne przebiega dwuetapowo. W tym przypadku jedna z reszt karboksylowych centrum aktywnego enzymu pełni funkcję kwasu/zasady, a druga nukleofila. W pierwszej fazie, na skutek jednoczesnego działania kwasu oraz nukleofila, odszczepieniu ulega grupa odchodząca oraz utworzony zostaje produkt pośredni- ester glikozyłowy. W drugim etapie cząsteczka wody, częściowo zdeprotonowana w wyniku działania naładowanej ujemnie reszty karboksylowej (zasady), atakuje węgiel anomeryczny i przerywa wiązanie estrowe (Rysunek 2.2.B.). Jeśli w bliskim otoczeniu reaktywnego produktu pośredniego znajdzie się inny, niż woda, akceptor reszty glikozydowej, enzym retencyjny zsyntetyzuje nowe wiązanie glikozydowe [Moracci i wsp. 2001; Withers i Williams, 2010]. Należy też nadmienić, że opisano hydrolazy glikozydowe, których mechanizm działania odbiega a nawet zasadniczo różni się od przedstawionego [Rye i Withers, 2000; Withers i Williams, 2010].

W odpowiednich warunkach retencyjne glikozydazy wykazują zdolność do syntetyzowania nowych wiązań glikozydowych, przy czym egzoglikozydazy przyłączają do odpowiedniego akceptora resztę monosacharydu [Buchowiecka i Bielecki, 2000b], a endoglikozydazy fragmenty cukrowe o różnym stopniu polimeryzacji [Buchowiecka i Bielecki, 2000a; Fajjes i Planas, 2007]. Proces ten może

przebiegać w dwojaki sposób: na drodze odwrotnej hydrolizy lub transglikozylacji [Olesienkiewicz i Grajek, 2005; Plou i wsp., 2007; Watt i wsp., 1997]. Odwrotna hydroliza jest procesem kontrolowanym termodynamicznie tzn. zachodzącym do chwili osiągnięcia równowagi. Równowagą hydrolizy/syntezy, w celu jej przesunięcia w kierunku tworzenia wiązań glikozydowych, można sterować poprzez obniżenie aktywności wody w środowisku, które osiąga się najczęściej dzięki stosowaniu wysokich stężeń substratów i/lub dodaniu do medium reakcyjnego rozpuszczalnika organicznego, a także poprzez usuwanie produktów reakcji [Crout i Vic, 1998; Olesienkiewicz i Grajek, 2005; Plou i wsp., 2007]. Przykładowo, tą metodą z monosacharydów lub mieszaniny monosacharydów i alkoholi otrzymuje się odpowiednio disacharydy oraz glikozydy, przy czym osiągnięte wydajności zwykle wynoszą około 20% [Plou i wsp., 2007]. Transglikozylacja jest procesem kontrolowanym kinetycznie, polegającym na enzymatycznym przeniesieniu reszty cukrowej z substratu (di-, oligo-, polisacharydu lub pochodnej cukru) na akceptor posiadający wolną grupę hydroksylową, ale inny niż woda. W tym kontekście hydrolizę można uważać za szczególny przypadek reakcji transglikozylacji. Transglikozylacji sprzyjają te same czynniki, co reakcji odwrotnej hydrolizy. W tym przypadku ważne jest również kontrolowanie przebiegu reakcji, bowiem w miarę ubywania substratu i wzrostu stężenia produktu/produktów do maksymalnego poziomu, hydroliza produktów może przeważać nad syntezą i prowadzić do obniżenia wydajności reakcji [Olesienkiewicz i Grajek, 2005]. Typowe wydajności uzyskiwane tą metodą sięgają około 40% [Plou i wsp., 2007].

W przeciwieństwie do glikozylotransferaz, hydrolazy glikozydowe nie wymagają skomplikowanych, aktywowanych donorów reszt glikozydowych, są stabilne i szeroko dostępne w handlu w postaci preparatów różniących się specyficznością, właściwościami oraz stopniem czystości [Bucke, 1996; Olesienkiewicz i Grajek, 2005]. Nowe glikozydazy są też stale identyfikowane [CAZY Database, 2010], klonowane oraz ulepszone metodami inżynierii genetycznej [Hancock i wsp., 2006]. Synteza katalizowana przez hydrolazy nie przebiega jednak tak stereo- i regioselektywnie, jak w przypadku transferaz glikozydowych. W jej wyniku powstaje najczęściej mieszanina produktów zróżnicowana pod względem konfiguracji wiązań i stopnia polimeryzacji [Olesienkiewicz i Grajek, 2005; Palcic, 1999; Plou i wsp., 2007; Scigelova i wsp., 1999].

2.2.2.1. Wpływ wybranych czynników na reakcje odwrotnej hydrolizy i transglikozylacji

Jak zasygnalizowano wcześniej, tylko retencyjne glikozydazy i tylko w określonych warunkach wykazują zdolność do katalizowania odwrotnej hydrolizy i/lub transglikozylacji. O stereo- i regioselektywności oraz wydajności obu reakcji decyduje przede wszystkim odpowiedni dobór enzymu i jego dawki, stężenie substratów i aktywność wody w środowisku reakcji, pH oraz temperatura procesu

[Olesienkiewicz i Grajek, 2005]. Na przebieg reakcji transglikozylacji wpływa ponadto struktura donora i akceptora reszty glikozylowej [Olesienkiewicz i Grajek, 2005].

Źródło enzymu ma podstawowe znaczenie dla syntezy połączeń glikozydowych. Od niego zależy, czy i w jakich warunkach dany enzym wykazuje zdolność katalizowania reakcji odwrotnej hydrolizy lub transglikozylacji. Jednym z nielicznych przykładów enzymu katalizującego obie reakcje jest β -glukozydaza z migdałów. W wyniku odwrotnej hydrolizy enzym ten wytwarzał glukooligosacharydy [Ravet i wsp., 1993] oraz różnorodne alkilo- i arylo- β -glukozydy [Vic i wsp., 1995]. Natomiast w reakcji transglikozylacji z *p*-nitrofenylo- β -D-glukopiranozydu oraz między innymi 3-metylo-2-buten-1-olu, 2-metylo-2-propen-1-olu i 2-benzoksy-1,3-diolu syntetyzował β -glukozydy, które następnie poddano przekształceniom chemicznym, prowadzącym do otrzymania trzech różnych cyjanoglukozydów [Akita i wsp., 1999]. Pochodzenie enzymu determinuje także regioselektywność transferu oraz stopień polimeryzacji otrzymywanych sacharydów. Dobrze obrazuje to przykład syntezy tGOS z zastosowaniem β -galaktozydaz z różnych źródeł. W zależności od pochodzenia aktywność specyficzna danego enzymu może wahać się od 0,5 U/mg w przypadku β -galaktozydazy z *Geobacillus stearothermophilus* do ponad 500 U/mg dla enzymów z *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* oraz *Alicyclobacillus acidocaldarius*, a produktywność procesu zmieniać się od 0,4 do 24 g/dm³/godz odpowiednio dla β -galaktozydazy z *Geobacillus stearothermophilus* i *Aspergillus oryzae* [Park i Oh, 2010]. Podczas transformacji laktozy do galaktozydów prowadzonej przy udziale β -galaktozydaz powstają głównie wiązania $\beta(1\rightarrow6)$ oraz rzadziej $\beta(1\rightarrow3)$ - glikozydowe [Mahoney, 1998]. Przemysłowe preparaty β -galaktozydaz z *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G) i *Aspergillus aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L, Novozymes) porównano pod kątem charakteru syntetyzowanych wiązań i stopnia polimeryzacji produktów [Cordelle-Cobas i wsp., 2009]. Pomimo że obydwa enzymy tworzyły głównie wiązania $\beta(1\rightarrow6)$, otrzymane mieszaniny tGOS różniły się zawartością poszczególnych sacharydów (na przykład Lactozym syntetyzował wyraźnie więcej allolaktozy (galaktozylo- $\beta(1\rightarrow6)$ -glukozy) niż Pectinex, ale mniej $\beta(1\rightarrow6)$ -galaktobiozy) oraz składem (galaktozylo- $\beta(1\rightarrow4)$ -laktozę zidentyfikowano jedynie wśród produktów Pectinexu). Głównym produktem konwersji laktozy katalizowanej przez immobilizowaną β -galaktozydazę z *Aspergillus niger* [Prensil i wsp., 1987] oraz wolny enzym z *Kluyveromyces fragilis* były trisacharydy, podczas gdy za pośrednictwem β -galaktozydaz z *Aspergillus oryzae* i *Bacillus circulans* uzyskano też znaczną ilość tetra- oraz pentasacharydów [Bonn i wsp., 2000]. Z drugiej strony, w przypadku syntezy disacharydów prowadzonej za pomocą β -galaktozydazy z *E. coli* oraz z *A. oryzae* na drodze odwrotnej hydrolizy nie stwierdzono wpływu pochodzenia enzymu i jego formy (enzym wolny lub immobilizowany) na wydajność i regioselektywność przemiany: z D-galaktozy i D-glukozy otrzymano mieszaninę β -D-galaktozylo-D-glukozydów połączonych wiązaniami (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) oraz

(1→6), natomiast z D-galaktozy i 2-acetamido-2-deoksy-D-glukozy uzyskano (1→4) oraz (1→6) β-D-galaktozylo-2-acetamido-2-deoksy-D-glukozę. W przypadku obu biotransformacji synteza izomeru β(1→6) wyraźnie dominowała [Ajisaka i wsp., 1988].

W reakcji odwrotnej hydrolizy wysokie stężenie substratów w mieszaninie reakcyjnej faworyzuje tworzenie połączeń glikozydowych, natomiast dla reakcji transglikozylacji bardzo istotny jest również stosunek stężeń donora i akceptora [Olesienkiewicz i Grajek, 2005]. W tym przypadku stężenie akceptora powinno być wyższe, niż donora, aby zminimalizować prawdopodobieństwo transferu reszty glikozydowej z jednej cząsteczki donora na drugą. Przykładowo, wydajność syntezy galaktozyloksylozy prowadzonej przy udziale β-galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* wzrosła z 16 do 21%, gdy stosunek molowy stężeń akceptora i donora (odpowiednio ksyloza i o-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd) zwiększono z 10 do 54 [Giacomini i wsp., 2002]. Wzrost stężenia substratów powyżej 0,16 i 1,0 M odpowiednio dla donora (p-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd) i akceptora (N-acetyloglukozamina) reszty glikozydowej, przy zachowaniu ich stałego stosunku molowego, nie poprawiał wydajności produkcji N-acetylolaktozaminy katalizowanej przez immobilizowaną β-galaktozydazę z *Bacillus circulans* [Hernaiz i Crout, 2000]. Podczas enzymatycznej produkcji tGOS za pomocą β-galaktozydazy z *Kluyveromyces lactis* zwiększenie początkowej zawartości laktozy w medium reakcyjnym z 0,64 M do 1,17 M podwajało uzysk galaktooligosacharydów [Chockchaisawasdee i wsp., 2005]. Z kolei w reakcji odwrotnej hydrolizy prowadzonej w środowisku acetonitryl/woda β-glukozydaza z migdała produkowała 2-hydroksybenzylo-β-D-glukopiranozyd z prawie trzy- i pięciokrotnie większą wydajnością, gdy stężenie alkoholu 2-hydroksybenzylowego zwiększono z 0,3 M do odpowiednio 0,6 i 0,85 M, zachowując stałe stężenie drugiego substratu- glukozy [Vic i wsp., 1995]. Co więcej, stopień polimeryzacji glukooligosacharydów syntetyzowanych przez ten enzym zależał od początkowego stężenia substratu. β-glukozydaza z migdała w 5 M roztworze glukozy produkowała jedynie disacharydy, a w 7,5 M także tri- i tetrasacharydy [Ravet i wsp., 1993].

W reakcjach transglikozylacji poprawę wydajności można osiągnąć dzięki stosowaniu donorów reszty glikozydowej posiadających dobre grupy odchodzące. Donor taki szybciej wchodzi w reakcję, skracając tym samym czas trwania procesu. Ponieważ posiada on większe powinowactwo do enzymu niż produkt transglikozylacji, zmniejsza prawdopodobieństwo hydrolizy tego produktu [van Rantwijk i wsp., 1999]. Wykorzystywane w syntezie aktywowane donory są najczęściej fluorowymi lub nitrofenylowymi pochodnymi sacharydów. Uzysk galaktozylo-glicerolu w reakcji katalizowanej przez immobilizowane β-galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* i *Kluyveromyces fragilis* był o około 30% wyższy, gdy zamiast laktozy, laktulozy lub metylo-β-D-galaktopiranozydu jako donory reszty galaktozy zastosowano fenylo- i o-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozydy [Woudenberg-van Oosterom i wsp., 1998].

Pod względem wykazywanej aktywności transglikozylacyjnej oraz regioselektywności transferu reszty glikozyłowej przeanalizowano szereg α -galaktozydaz oraz N-acetyloheksozaminidaz wyizolowanych z różnorodnych surowych preparatów enzymatycznych. Znakomita większość spośród badanych α -galaktozydaz syntetyzowała z *p*-nitrofenylo- α -D-galaktopiranozydu jako donora i metylo- β -D-galaktopiranozydu jako akceptora reszty glikozydowej disacharydy połączone wiązaniem $\alpha(1\rightarrow6)$, a niektóre także śladowe ilości produktów $\alpha(1\rightarrow3)$. Roślinne i drobnoustrojowe N-acetyloheksozaminidazy katalizowały głównie tworzenie mieszaniny disacharydów połączonych wiązaniami $\beta(1\rightarrow4)$ oraz $\beta(1\rightarrow6)$, korzystając z *p*-nitrofenylo-N-acetylo- β -D-glukopiranozydu jako donora reszty glikozydowej i N-acetyloglukozaminy jako akceptora [Scigelova i wsp., 1999]. Stosując *o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozyd jako donor reszty glikozydowej oraz ksylozę w charakterze akceptora, otrzymano za pomocą β -galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* mieszaninę galaktozyloksyloz [Giacomini i wsp., 2002]. Podczas syntezy pochodnych disacharydów katalizowanej przez β -glukozydazę z *Agrobacterium* sp. użyto *p*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu i fluoro- β -D-mannozydu w roli donorów reszt glikozydowych oraz tiofenylowych i tiobenzylowych pochodnych ksylozy i galaktozy jako akceptorów. Większość otrzymanych na tej drodze dwucukrów połączona była wiązaniami $\beta(1\rightarrow3)$ i/lub $(1\rightarrow4)$. Wyjątek stanowiły sacharydy uzyskane w przypadku akceptorów β -D-galaktozydowych, które zawierały wiązania $\beta(1\rightarrow3)$ i $(1\rightarrow6)$ [Prade i wsp., 1998].

Rozpuszczalniki organiczne dodane do medium reakcyjnego mogą zwiększać wydajność odwrotnej hydrolizy i transglikozylacji poprzez obniżanie aktywności wody, a tym samym zmniejszanie jej dostępności jako akceptora reszty glikozyłowej. Niemniej jednak pewna minimalna ilość wody (około 10%) jest konieczna do podtrzymania aktywności enzymu [Hansson i Adlercreutz, 2001; Tong i wsp., 2005; van Rantwijk i wsp., 1999; Vic i wsp., 1995]. Nie wszystkie enzymy są jednakowo odporne na obecność rozpuszczalnika organicznego w mieszaninie reakcyjnej. β -D-glukozydaza z migdała wykazywała wysoką stabilność i najwyższą aktywność syntetyczną w mieszaninie acetonitrylu i wody 9:1 (v/v) [Vic i wsp., 1995]. W tych warunkach z glukozy oraz różnych alkoholi otrzymano 16 alkilowych lub arylowych β -glukozydów. W przypadku alkoholi alifatycznych wydajność syntezy malała ze wzrostem ich hydrofobowości, natomiast obecność grupy hydroksylowej w pierścieniu aromatycznym alkoholu zwiększała ilość syntetyzowanego produktu. Ten sam enzym tracił aktywność w obecności DMSO, ale zachowywał ją w mieszaninie dioksanu i buforu 9:1 (v/v), w której za jego pośrednictwem z glukozy i alkoholu *p*-nitrobenzylowego otrzymano *p*-nitrobenzylo- β -D-glukopiranozyd [Tong i wsp., 2005]. W przypadku hipertermofilnej β -glikozydazy Gly-001-02 z biblioteki CloneZyme za pomocą zmian zawartości acetonu w środowisku reakcji, prowadzących do zmiany aktywności wody, faworyzowano syntezę [Cruz-Guerrero i wsp., 2006]. Wydajność transglikozylacji z udziałem

β -galaktozydazy z *A. oryzae* malała zarówno w 50% (v/v) acetonie, jak i 50% (v/v) DMF, za to jej szybkość rosła [Giacomini i wsp., 2002]. Próba poprawienia wydajności syntezy oligosacharydów prowadzonej z użyciem α -amylazy z *Bacillus licheniformis* przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej etanolu, metanolu, n-propanolu, propanodiolu, n-butanolu, dioksanu oraz DMSO zakończyła się niepowodzeniem [Chitradon i wsp., 2000]. Dodanie do środowiska reakcji alkoholu cukrowego (sorbitolu), niepowodującego denaturacji białek, zwiększyło wydajność syntezy β -glukooligosacharydów prowadzonej przez wolną β -D-glukozydazę z migdała, ale nie wpłynęło na reakcję katalizowaną przez enzym unieruchomiony [Ravet i wsp., 1993].

Obniżanie aktywności wody w środowisku reakcji za pomocą alkoholi, szczególnie I-rzędowych, może prowadzić do powstawania produktów ubocznych- alkilowych pochodnych cukrów. Nie stanowi to problemu, gdy stosowany alkohol jest jednocześnie substratem w reakcji. Hydrolazy glikozydowe z powodzeniem katalizują glikozylację alkoholi. W przemianach tego typu reaktywność glikozydaz względem grup hydroksylowych maleje w szeregu: alkohole I-rzędowe > II-rzędowe > fenole. Alkohole III-rzędowe nie są akceptowane przez glikozydazy jako akceptory [van Rantwijk i wsp., 1999]. Dla egzo-(1,4)- β -D-galaktanazy z *Aspergillus niger* dogodnymi akceptorami reszty glikozydowej okazały się metanol, etanol, n-propanol i n-butanol. Galaktanaza nie katalizowała przeniesienia reszty galaktozy na izopropanol [Bonnin i wsp., 1999]. Z udziałem α -amylazy z *A. oryzae* otrzymano szereg alkilowych maltooligosacharydów. W obecności metanolu pod wpływem enzymu ze skrobi powstawały głównie metylomaltozydy oraz metylomaltotriozydy, w obecności etanolu, propanolu lub butanolu alkilowe di- lub tetraglikozydy, natomiast alkohol benzyłowy wchodził w skład tri- lub pentaglikozydów. Heksyłowych i oktyłowych pochodnych sacharydów nie uzyskano prawdopodobnie z powodu niskiej rozpuszczalności tych alkoholi w wodzie [Larsson i wsp., 2005]. Żadnych produktów alkoholizy nie otrzymano natomiast wskutek działania α -amylazy z *Bacillus licheniformis* na skrobię w obecności metanolu, etanolu, n-propanolu, propanodiolu oraz n-butanolu [Chitradon i wsp., 2000]. Z kolei β -D-glukozydaza z migdała okazała się przydatna do otrzymywania alilowych i benzyłowych pochodnych glukozy i galaktopiranozy na drodze odwrotnej hydrolizy prowadzonej w środowisku zawierającym ponad 90% v/v alkoholu alilowego lub benzyłowego [Vic i Crout, 1995]. Wśród licznych publikacji dotyczących glikozylacji alkoholi znajdują się również doniesienia na temat przeniesienia reszty glikozydowej na grupę hydroksylową złożonego alkoholu [Koeller i Wong, 2000; van Rantwijk i wsp., 1999].

Podwyższona temperatura zwiększa rozpuszczalność substratów oraz obniża lepkość medium reakcyjnego, przez co znacząco poprawia warunki wymiany masy w środowisku. Jeśli nie powoduje denaturacji enzymu, powinna wywierać korzystny wpływ na reakcje syntezy. Tymczasem podwyższenie temperatury nie wpłynęło na syntezę oligosacharydów katalizowaną przez α -amylazę z *Bacillus licheniformis* [Chitradon i wsp., 2000] oraz znikomo poprawiło wydajność produkcji

galaktooligosacharydów prowadzonej z zastosowaniem β -galaktozydaz z *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces fragilis* [Boon i wsp., 2000]. Odpowiednio wysoka temperatura ma za to zasadnicze znaczenie dla reakcji katalizowanych przez glikozydazy termofilne i hipertermofilne. W przypadku hipertermofilnej β -glikozydazy Gly-001-02 z biblioteki CloneZyme wzrost temperatury powodował zwiększenie wydajności transglikozylacji [Cruz-Guerrero i wsp., 2006], ale praktycznie nie wpłynął na syntezę alkiloglukozydów katalizowaną przez β -glukozydazę z *Pyrococcus furiosus* [Hanson i Adlercreutz, 2001]. Należy przy tym mieć na uwadze, że w warunkach reakcji odwrotnej hydrolizy i transglikozylacji, przy wysokim stężeniu cukrów redukujących w medium reakcyjnym, podwyższenie temperatury promuje powstawanie produktów reakcji Maillarda, które hamują aktywność hydrolaz glikozydowych [Bruins i wsp., 2003 a i b].

pH środowiska wpływa na konformację enzymu, co może hamować hydrolizę i sprzyjać syntezie, jak również może modyfikować specyficzność substratową biokatalizatora [Olesienkiewicz i Grajek, 2005]. Wpływ pH środowiska na wydajność odwrotnej hydrolizy nie został jednoznacznie określony [Bielecki i wsp., 1999]. Dla β -glukozydazy z migdałów w medium organiczno-wodnym nie zaobserwowano wzrostu/spadku wydajności katalizowanej reakcji wynikającej ze zmian pH [Vic i wsp., 1995] lub stwierdzano jedynie bardzo niewielką poprawę wydajności w wyższym pH [Tong i wsp., 2005]. Olesienkiewicz i Grajek [2005] w artykule przeglądowym podają, że procesom transglikozylacji sprzyja zazwyczaj środowisko bardziej alkaliczne. Stwierdzenie to jest prawdziwe w przypadku β -galaktanazy z *Aspergillus niger*, która w środowisku wodnym wykazywała wyraźne maksimum aktywności hydrolitycznej w pH około 3,5, a transglikozylacyjnej w pH bliskim neutralnego [Bonnin i Thibault, 1996]. Podwyższenie pH z 4,5 do 5,5 poprawiło wydajność syntezy tGOS katalizowanej przez β -galaktozydazę z *Aspergillus niger*. W tych samych warunkach efektywność β -galaktozydazy z *Penicillium canescens* malała, ale synteza przebiegała bardziej selektywnie- w niższym pH uzyskiwano mieszaninę di- i trigalaktozydów, w wyższym tylko trigalaktozyd [Bednarski i Kulikowska, 2007]. Co ciekawe, w wyniku działania α -amylazy z *Aspergillus oryzae* ze skrobi i alkoholu benzyloвого w pH 5,0 powstawał głównie benzylo- α -glukopiranozyd, natomiast w pH 7,0 dominującym produktem był benzylo- α -maltopiranozyd [Park i wsp., 1999]. Podobnego efektu nie zaobserwowano podczas syntezy alkilo-maltooligosacharydów ze skrobi i różnych alkoholi z udziałem tejże α -amylazy. W tym przypadku hydroliza i transglikozylacja przebiegały najszybciej w pH 5,0-6,0 [Larsson i wsp., 2005]. Również badania własne dotyczące rekombinantowej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* nie wykazały zasadniczej różnicy pomiędzy optymalnym pH hydrolizy i transglikozylacji. Znikomy był także wpływ pH na produkcję tGOS katalizowaną przez unieruchomioną β -galaktozydazę z *Aspergillus oryzae* [Albayrak i Yang, 2002]. Trudno sformułować ogólny wniosek na temat wpływu pH na reakcje

odwrotnej hydrolizy i transglikozylacji, zależy on bowiem dodatkowo od samego enzymu, jego formy (wolny/unieruchomiony) oraz obecności rozpuszczalników organicznych w medium reakcyjnym.

Przytoczone przykłady wskazują, że ze względu na różnorodność hydrolaz glikozydowych, odmienność ich właściwości oraz wielość czynników determinujących selektywność i wydajność reakcji odwrotnej hydrolizy i transglikozylacji, konieczny jest staranny wybór najodpowiedniejszego biokatalizatora, jak również uważna optymalizacja warunków prowadzenia procesu.

2.2.2.2. Zastosowanie termofilnych glikozydaz w syntezie glikozydów i oligosacharydów

Szczególną pod względem wykazywanych właściwości grupę biokatalizatorów stanowią enzymy pochodzące z organizmów termofilnych oraz hipertermofilnych [Eichler, 2001; Hough i Danson, 1999; Niehaus i wsp., 1999]. Enzymy te pozwalają na prowadzenie procesów biotechnologicznych w podwyższonych temperaturach, co z kolei skutkuje zwiększeniem rozpuszczalności i dyfuzji substratów w środowisku reakcji, zmniejszeniem lepkości medium reakcyjnego oraz obniżeniem ryzyka wystąpienia zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Biokatalizatory termo- i hipertermofilne wykazują często większą odporność na obecność rozpuszczalników organicznych w środowisku reakcji, niż enzymy pochodzące z organizmów mezofilnych [Doukyu i Ogino, 2010]. Coraz większa dostępność termozymów wynika m.in. z możliwości ich produkcji w komórkach mezofilnych gospodarzy. Większość rekombinantowych enzymów zachowuje termostabilność i prawidłową strukturę III-rzędową oraz może być oczyszczana na drodze termicznej precypitacji termolabilnych białek gospodarza, co znacznie obniża koszt i upraszcza proces ich pozyskiwania [Bruins i wsp., 2001; Niehaus i wsp., 1999]. Ponieważ wraz ze wzrostem temperatury rośnie szybkość reakcji chemicznych, oczekiwano, że w obecności termozymów przemiany będą zachodzić szybciej, niż przy udziale enzymów mezofilnych. Eksperymentalne wartości K_M i V_{max} enzymów termofilnych i mezofilnych wyznaczone w ich temperaturach optymalnych nie wykazywały jednak znaczących różnic [Bruins i wsp., 2001].

Pomimo, że opisano liczne enzymy termofilne aktywne względem sacharydów [Bruins i wsp., 2001; Eichler, 2001; Niehaus i wsp., 1999], dotychczas stosunkowo niewiele z nich znalazło zastosowanie w syntezie wiązań glikozydowych, ale ta liczba wciąż rośnie. Z *o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu i N-acetyloglukozoaminy otrzymano N-acetylolaktozoaminę za pomocą trzech termostabilnych rekombinantowych β -galaktozydaz z biblioteki CloneZyme [Li i Wang, 1997], przy czym reakcja charakteryzowała się wysoką wydajnością i regioselektywnością. Z tej samej biblioteki pochodziła hipertermofilna β -glikozydaza, zastosowana w syntezie galaktooligosacharydów z laktozy w środowisku wodno-acetonowym [Cruz-Guerrero i wsp., 2006]. Kataliza transferu glukozy z celbiozy na resztę glukozy akceptora (arbutyny) z udziałem rekombinantowej β -glukozydazy z hipertermofilnej bakterii *Thermotoga neapolitana* prowadziła do otrzymania mieszaniny produktów połączonych

wiązaniami $\beta(1\rightarrow3)$ -, $(1\rightarrow4)$ - oraz $(1\rightarrow6)$ -glikozydowymi [Park i wsp., 2005]. Aktywność transglikozylacyjną rekombinantowej β -glikozydazy z *Sulfolobus shibatae* badano w obecności laktozy jako donora reszty glikozydowej oraz wybranych akceptorów (fruktozy, ramnozy, celobiozy, sacharozy, maltozy, sorbitolu i mannitolu). Najodpowiedniejszym akceptorem okazała się sacharoza, a katalizowana reakcja przebiegała wysoce regioselektywnie- jedynym uzyskanym produktem była β -D-galaktopiranozylo-($1\rightarrow6$)-sacharoza [Park i Baek i wsp., 2005]. Potencjał transglikozylacyjny zaobserwowano także w przypadku α -ksylozydazy produkowanej przez *Sulfolobus solfataricus* [Moracci i wsp., 2001]. Enzym ten katalizował przeniesienie ksylozy z *p*-nitrofenylo- α -ksylozy na *p*-nitrofenylo- β -glukozę, przy czym dominującym produktem był izomer $\beta(1\rightarrow6)$. Z kolei za pośrednictwem β -glikozydazy z *Pyrococcus furiosus* dzikiego typu oraz dwóch pokrewnych enzymów, posiadających mutacje punktowe w obrębie centrum katalitycznego, w środowisku heksan/woda otrzymano heksylo- β -D-glukopiranozyd z pentylo- β -D-glukopiranozydu, przy czym enzymy zmutowane wykazywały większą aktywność transglikozylacyjną [Hanson i Adlercreutz, 2001]. Pod względem przydatności do syntezy galaktooligosacharydów porównano β -glikozydazy z *Pyrococcus furiosus* i *Sulfolobus solfataricus* [Petzelbauer i wsp., 2000]. W obu przypadkach produktami były di- i trisacharydy połączone wiązaniami $\beta(1\rightarrow3)$ i $(1\rightarrow6)$, a enzymy wykazywały tendencję do kumulowania izomeru $\beta(1\rightarrow6)$. Enzym z *S. solfataricus* okazał się wydajniejszym katalizatorem transglikozylacji. Przy jego udziale otrzymano też więcej trisacharydów. Aktywność transglikozylacyjną zaobserwowano również w przypadku β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* [Wanarska, 2005].

2.2.3. Glikosyntazy

Glikosyntazy stanowią stosunkowo nową grupę enzymów wywodzącą się z retencyjnych egzo- lub endoglikozydaz, które na skutek wprowadzenia mutacji punktowej w obrębie centrum katalitycznego zostały pozbawione aktywności hydrolitycznej, lecz zachowały zdolność tworzenia wiązań glikozydowych [Mackenzie i wsp., 1998]. Mutacja ta najczęściej polega na zastąpieniu aminokwasu karboksylowego, pełniącego funkcję nukleofila, aminokwasem nienukleofilowym (Gly, Ala lub Ser), co uniemożliwia enzymowi tworzenie z substratem produktu pośredniego [Moracci i wsp., 2001b; Withers, 2001]. Glikosyntazy tego typu wymagają zatem aktywowanych donorów (fluorków glikozylowych [Williams i Withers, 2000]) o konfiguracji węgla anomerycznego odwrotnej niż w normalnym substracie odpowiedniej glikozydazy, z którymi mogą utworzyć kompleks imitujący produkt pośredni powstający podczas klasycznej transglikozylacji (Rysunek 2.3.A.) [Mackenzie i wsp., 1998; Plou i wsp., 2007; Withers, 2001]. Innym rozwiązaniem jest stosowanie donora o niezmienionej konfiguracji węgla anomerycznego i z dobrą grupą odchodzącą w połączeniu z nukleofilem zewnętrznym- mrówczanem

sodu, który w zastępstwie aminokwasu karboksylowego utworzy z substratem produkt pośredni (Rysunek 2.3.B.) [Moracci i wsp., 2001b; Perugino i wsp., 2004]. Glikosyntazy drugiego rodzaju posiadają mutację w miejscu aminokwasu pełniącego funkcję kwasu/zasady. Wykorzystują one donory z dobrymi grupami odchodzącymi (np. dinitrofenyloglikozydy) oraz silnie nukleofilowe akceptory, takie jak tioglikozydy (Rysunek 2.3.C.). Enzymy te, nazywane również tioglikoligazami, są narzędziami umożliwiającymi syntetyzowanie *in vitro* wiązań S-glikozydowych [Bojarová i Křen, 2009; Daines i wsp., 2004; Hancock i wsp., 2006; Hult i Berglund, 2003]. Wspomniane wiązania można również uzyskać w wyniku kondensacji fluorków glikozydowych jako donorów oraz tioglikozydowych akceptorów, katalizowanej przez tioglikosyntazy- enzymy ze zmodyfikowanymi obydwoma karboksylowymi aminokwasami centrum katalitycznego (Rysunek 2.3.D.) [Bojarová i Křen, 2009; Hancock i wsp., 2006].

Glikosyntazy nie wykazują aktywności hydrolitycznej, dlatego wydajności uzyskiwane przy ich udziale są znacznie wyższe, niż w przypadku hydrolaz glikozydowych, i mogą nawet przekraczać 90% [Plou i wsp., 2007]. Należy zatem oczekiwać, że liczba nowych glikosyntaz, w tym endoenzymów [Fajjes i Planas, 2007], i ich zastosowań będzie się zwiększać [Wang i Huang, 2009; Hancock i wsp., 2006], tym bardziej, że niedawno sukcesem zakończyła się próba przekształcenia w glikosyntazę inwertującej hydrolazy glikozydowej [Honda i Kitaoka, 2006].

2.2.4. Transglikozydazy

Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej przyporządkował transglikozydazy do klasy transferaz glikozydowych (EC 2.4.x.y). Jednak zgodnie z nowszą klasyfikacją, opartą na podobieństwie sekwencji aminokwasowej enzymów aktywnych względem węglowodanów, transglikozydazy zalicza się do hydrolaz glikozydowych [CAZy Database, 2010]. Kwestia systematyki tych enzymów pozostaje wciąż nierozstrzygnięta.

Transglikozydazy działają według tego samego mechanizmu, co retencyjne hydrolazy glikozydowe (Rysunek 2.2.B.). Katalizują przeniesienie reszty glikozydowej z donorów takich jak di-, oligo- lub polisacharydy na akceptory cukrowe. Funkcję akceptora mogą pełnić również złożone związki chemiczne, na przykład poliaromatyczne flawonoidy [Monsan i wsp., 2010], alkohole [Olesienkiewicz i Grajek, 2005] oraz woda. Transglikozydazy wykazują zatem niewielką aktywność hydrolityczną. Najważniejszymi enzymami tego rodzaju są transglukozydazy oraz transfruktozydazy [Plou i wsp., 2007]. Do pierwszej grupy należą glukosacharazy, takie jak dekstranosacharaza, amylosacharaza, mutanosacharaza, alteranosacharaza i reuteranosacharaza, wykorzystujące sacharozę do syntezy glukooligo- i glukopolisacharydów [Monsan i wsp., 2010], oraz glukanotransferaza cyklodekstryn katalizująca głównie wewnątrzcząsteczkową transglukozyzację, w wyniku której ze skrobi powstają cyklodekstryny [Plou i wsp., 2007]. Wśród transfruktozidaz, syntetyzujących β -fruktany z reszt

fruktozylowych odszczepianych od sacharozy, wymienić należy lewanosacharazę, inulinosacharazę oraz transfruktozydazy wytwarzające krótkołańcuchowe fruktooligosacharydy [Plou i wsp., 2007].

Transglikozydazy katalizują tworzenie wiązań glikozydowych mniej specyficznie niż glikozylotransterazy, ale w przeciwieństwie do nich nie wymagają aktywowanych donorów reszt glikozydowych. Pod względem specyficzności i wydajności syntezy przewyższają typowe hydrolazy glikozydowe. Nie są jednak tak rozpowszechnione i różnorodne. Sytuacja ta może wkrótce ulec zmianie, ponieważ wciąż prowadzone są prace badawcze, mające na celu przekształcenie retencyjnych glikozydaz w transglikozydazy poprzez spotęgowanie na drodze ukierunkowanej ewolucji ich potencjału transglikozylacyjnego i zminimalizowanie aktywności hydrolitycznej [Kone i wsp., 2009; Hancock i wsp., 2006].

3. Zastosowanie immobilizowanych enzymów i komórek drobnoustrojów w biosyntezie

3.1. Immobilizowane enzymy

Immobilizację enzymu można zdefiniować jako fizyczne zamknięcie lub zlokalizowanie biokatalizatora w określonym obszarze przy zachowaniu jego aktywności [Brena i Batista-Viera, 2006]. Podstawowym celem unieruchamiania enzymów jest umożliwienie prowadzenia procesu w sposób ciągły, ewentualnie wielokrotnego użycia pojedynczej porcji biokatalizatora w odrębnych szarżach produkcyjnych. Unieruchomione enzymy, w porównaniu z preparatami w stanie wolnym, są często bardziej stabilne, ułatwiają prowadzenie procesu i pozwalają go w dogodny sposób kontrolować, ułatwiają oddzielanie katalizatora od mieszaniny poreakcyjnej oraz mogą być stosowane w większości typów reaktorów [Chmiel, 1998; Brena i Batista-Viera, 2006]. Immobilizacja generuje jednak dodatkowe koszty, może powodować obniżenie aktywności enzymu, a także zmniejszenie wydajności katalizowanej reakcji poprzez pogorszenie warunków wymiany masy pomiędzy warstwą graniczną, otaczającą enzym, a pozostałą objętością medium reakcyjnego [Brena i Batista-Viera, 2006]. W przypadku transglikozylacji lub odwrotnej hydrolizy prowadzonej z zastosowaniem hydrolaz glikozydowych zjawisko to jest szczególnie niekorzystne, ponieważ utrudniona dyfuzja substratu w kierunku enzymu oraz zsyntetyzowanego glikozydu w kierunku środowiska reakcji może skutkować pogorszeniem wydajności procesu [Albayrak i Yang, 2002]. Z drugiej strony, gdy reakcja prowadzona jest w środowisku wodno-organicznym, immobilizacja często pozwala zachować aktywność enzymu poprzez przeciwdziałanie jego denaturacji pod wpływem rozpuszczalnika organicznego [Adlercreutz, 2006]. Ponadto, w odniesieniu do multimerycznych enzymów, unieruchomienie na nośniku i usieciowanie może zapobiegać dysocjacji podjednostek, stabilizować i wydłużać żywotność biokatalizatora [Mateo i wsp., 2006 b].

Nośniki enzymów najogólniej dzieli się na organiczne i nieorganiczne (Rysunek 3.1.). Struktura matryc organicznych charakteryzuje się większą różnorodnością reaktywnych grup uczestniczących w wiązaniu enzymów ze złożem (grupy hydroksylowe, karboksylowe, aminowe itd.), w porównaniu z budową nośników nieorganicznych (najczęściej grupy hydroksylowe). Te drugie z kolei wykazują zwykle większą termostabilność, w mniejszym stopniu utrudniają przepływ medium reakcyjnego przez reaktor, a ich powierzchnię można aktywować poprzez przyłączenie grup wiążących biokatalizator. Do aktywacji grup hydroksylowych nośników nieorganicznych (np. żel krzemionkowy, szkło porowate, spieki ceramiczne, tlenki metali) wykorzystuje się z reguły 3-aminopropylotrietoksylan, rzadziej BCl_3 lub SiCl_4 , a w następnym etapie diaminę alifatyczną. Różnym modyfikacjom chemicznym poddawane są także nośniki organiczne [Bickerstaff, 1997].

Najczęściej wyróżnia się cztery grupy metod unieruchamiania enzymów [Chmiel, 1998]:

- I. Wiązanie na powierzchni nośnika
- II. Wiązanie w porach nośnika
- III. Zamykanie wewnątrz półprzepuszczalnych membran
- IV. Immobilizacja bez zastosowania nierozpuszczalnego nośnika.

Bardziej ogólna klasyfikacja to podział na metody odwracalne i nieodwracalne [Brena i Batista-Viera, 2006]. Enzym jest unieruchomiony nieodwracalnie, gdy oddzielenie go od nośnika wiąże się z pozbawieniem biokatalizatora aktywności lub zniszczeniem nośnika. Większość metod immobilizacji, za wyjątkiem adsorpcji enzymu na powierzchni nośnika oraz kowalencyjnego wiązania enzymu z nośnikiem za pośrednictwem mostków dwusiarczkowych, należy do drugiej kategorii [Brena i Batista-Viera, 2006].

Łączenie enzymu z powierzchnią nośnika może odbywać się na drodze adsorpcji lub tworzenia wiązań kowalencyjnych. Ten rodzaj immobilizacji w najmniejszym stopniu ogranicza transport masy pomiędzy enzymem a medium reakcyjnym. Adsorpcja następuje dzięki oddziaływaniom van der Waalsa, wiązaniom jonowym i wodorowym oraz oddziaływaniom hydrofobowym pomiędzy enzymem a złożem. Jest to technika bardzo popularna ze względu na szybkość i prostotę wykonania. Oddziaływania adsorpcyjne należą do słabych, dlatego podczas procesu może następować uwalnianie enzymu do medium otaczającego nośnik, nasilające się pod wpływem zmian warunków reakcji (na przykład zmiana pH, siły jonowej, temperatury). Zjawisko to niekiedy jest korzystne, ponieważ umożliwia regenerację nośnika. Często wykorzystywanymi nośnikami są żywice jonowymienne, na przykład karboksymetyloceluloza, dietyloaminoetyloceluloza, dietyloaminoetylodekstran i inne. Żywica jonowymienna tym silniej wiąże enzym, im większa ilość grup obdarzonych ładunkiem znajduje się na jej powierzchni. Alternatywę dla typowych anionitów czy kationitów stanowią porowate nośniki pokryte warstwą polimeru jonowego, takie jak żywice zawierające grupy epoksydowe, glioksydowe, czy

aminowe kowalencyjnie powleczone polietylenoiminą, polialliloaminą lub polialdehydem dekstranowym modyfikowanym asparaginanem (ang. aspartic-aldehyde-dextran), albo żywice jonowymienne pokryte polimerem o przeciwnym ładunku (np. nośnik z grupami aminowymi pokryty sulfonowanym dekstranem), które zapewniają wysoką gęstość ładunku na powierzchni [Mateo i wsp., 2006 c]. Immobilizacja oparta na oddziaływaniach hydrofobowych jest szczególnie korzystna dla lipaz. Enzymy te nawet w środowisku wodnym o niskiej sile jonowej eksponują silnie hydrofobowe regiony, dzięki czemu w łagodnych warunkach efektywnie adsorbują na powierzchni agarozy modyfikowanej łańcuchami alkilowymi (na przykład: butylowymi, fenyłowymi, oktyłowymi lub oktadecylowymi). Interakcje z nośnikiem zwykle aktywują lipazy i umożliwiają ich stosowanie w każdym rodzaju medium reakcyjnego [Palomo i wsp., 2006].

Immobilizacja kowalencyjna zapewnia silniejsze połączenie enzymu ze złożem, może jednak obniżyć jego aktywność, szczególnie gdy biorą w niej udział reszty aminokwasów bezpośrednio zaangażowanych w katalizę lub wiązanie substratu, lub gdy połączenie z nośnikiem ogranicza zmiany konformacyjne enzymu. Wiązania kowalencyjne tworzą najczęściej obecne w strukturze enzymu łańcuchy boczne lizyny (grupy ϵ -aminowe), cysteiny (grupy tiolowe), kwasu asparaginowego lub glutaminowego (grupy karboksylowe) [Brena i Batista-Viera, 2006].

Kowalencyjne unieruchomienie enzymów z reguły wymaga uprzedniej aktywacji nośnika. Karbodiimid jest odczynnikiem aktywującym grupy karboksylowe, które dzięki niemu mogą następnie utworzyć wiązanie peptydowe z wolnymi grupami aminowymi enzymu. Z kolei działanie bromocyjanem na grupy hydroksylowe nośnika prowadzi do powstania cyjanianoestru zdolnego do reakcji z wolną grupą aminową enzymu i utworzenia wiązania izomocznikowego. Jeśli złoże posiada l-rzędowe aminy aromatyczne, mogą one zostać przekształcone w sole diazoniowe za pomocą kwasu azotowego (III), a na dalszym etapie sprzężone z pierścieniem aromatycznym łańcucha bocznego tyrozyny [Bickerstaff, 1997; Novick i Rozzell, 2005]. Jednak najpowszechniej stosowanym rozwiązaniem jest łączenie wolnych grup aminowych obecnych w strukturze enzymu z grupami aminowymi na powierzchni nośnika za pośrednictwem aldehydu glutarowego. Powstająca w tym przypadku zasada Schiffa może zostać zredukowana borowodorkiem sodu do bardziej stabilnego wiązania pojedynczego [Betancor i wsp., 2006; Novick i Rozzell, 2005]. Zamiast aldehydu glutarowego używane są niekiedy diizocyjaniany lub tioizocyjaniany [Novick i Rozzell, 2005].

Efektywne i stabilne wiązanie enzymów przebiegające w łagodnych warunkach, bez konieczności aktywacji nośnika i stosowania dodatkowych czynników kondensujących, umożliwiają złoża epoksydowe (np. Eupergit C). Grupy aminowe, tiolowe oraz ugrupowania fenolowe łańcuchów bocznych aminokwasów uczestniczą w tworzeniu odpowiednio wiązania amidowego, tioeterowego i eterowego z wolnymi grupami epoksydowymi na powierzchni nośnika. Pozostałe grupy epoksydowe

blokowane są najczęściej β -merkptoetanołem, co zapobiega zmianom aktywności biokatalizatora na skutek oddziaływań hydrofobowych między nimi i enzymem [Mateo i wsp., 2006 a]. Bezpośrednio z wolnymi grupami aminowymi enzymów reagować mogą także ugrupowania karbonylowe uzyskane w wyniku utlenienia grup hydroksylowych obecnych w strukturze nośników polisacharydowych za pomocą NaIO_4 [Brena i Batista-Viera, 2006]. Substancje wiążących nie wymaga również tworzenie mostków dwusiarczkowych pomiędzy grupami tiolowymi enzymów a ugrupowaniami 2-pirydylodisulfidowymi, tiosulfonianowymi lub tiosulfonianowymi modyfikowanego nośnika, najczęściej agarozy, ale także celulozy, dekstranu, żywic epoksydowych [Batista-Viera, 2006]. Metoda ta jest odwracalna, pozwala bowiem na regenerację nośnika poprzez usunięcie zdezaktywowanego w czasie procesu enzymu za pomocą β -merkptoetanolu lub ditiotretolu i ponowne naniesienie świeżego, aktywnego biokatalizatora. Możliwość regeneracji jest właściwością pożądaną ze względu na wysoki koszt wielu nośników wykorzystywanych do immobilizacji enzymów.

Unieruchomienie na powierzchni może następować również dzięki specyficznym oddziaływaniami pomiędzy biokatalizatorem a nośnikiem. W tym przypadku albo nośnik modyfikowany jest poprzez przyłączenie ligandów wykazujących powinowactwo do enzymu, albo enzym sprzęgany z odpowiednim ligandem specyficznie wiążącym się z nośnikiem [Roy i Gupta, 2006]. Swoiste ugrupowania aktywujące nierozpuszczalne złoża, takie jak przeciwciała, lektyny, peptydy, barwniki lub kompleksy metali, są kowalencyjnie osadzone na jego powierzchni. Metoda osadzania musi być tak dobrana, by biospecyficzne rejony ligandów, zwłaszcza przeciwciał oraz lektyn, były dostępne dla immobilizowanych enzymów [Roy i Gupta, 2006]. Lektyną często stosowaną jako swoisty ligand jest konkanawalina A, która wykazuje powinowactwo względem reszt α -D-mannozylowych oraz α -D-glukozylowych [Saleemuddin i Husain, 1991]. Białko to jest zatem szczególnie przydatne do immobilizacji glikoenzymów.

Modyfikacja enzymów ugrupowaniami oddziałującymi specyficznie z nośnikiem jest rozwiązaniem bardziej popularnym. Wspomniane ugrupowania zwykle dołączane są metodami inżynierii genetycznej do N- lub C-końca sekwencji aminokwasowej enzymu (daleko od centrum katalitycznego) [Roy i Gupta, 2006]. Przykładem takiej modyfikacji jest wprowadzanie do struktury biokatalizatorów domen oligohistydynowych, które umożliwiają specyficzną i odwracalną (desorpcja biokatalizatora ze złoża następuje pod wpływem imidazolu) immobilizację rekombinantowych enzymów na matrycach eksponujących koordynacyjnie związane metale wielowartościowe, z reguły nikiel. Powinowactwo domen histydynowych do wielowartościowych kationów metali wykorzystywane jest głównie podczas oczyszczania rekombinantowych enzymów, ale znane są również doniesienia dotyczące katalizowania reakcji za pomocą takich biokatalizatorów [Dräger i wsp., 2007]. W wyniku manipulacji genetycznych otrzymano także białka fuzyjne enzymów z kalmoduliną, która za pośrednictwem kationów wapnia

efektywnie wiąże się z nośnikami modyfikowanymi fenotiazyną, specyficznym ligandem kalmoduliny [Daunert i wsp., 2007]. Desorpcję biokatalizatora ze złoża prowadzi się za pomocą odczynników chelatujących Ca^{2+} . Kolejnym przykładem jest dołączanie do enzymów domen peptydowych wykazujących wysokie powinowactwo do celulozy (tzw. CBD; ang. cellulose binding domain) i umożliwiających immobilizację na nośnikach celulozowych [Terpe, 2003]. Ponieważ obecnie opisywanych jest coraz więcej białek i peptydów specyficznie wiążących sacharydy (CBM, ang. carbohydrate-binding modules) [Boraston i wsp., 2004; CAZy Database, 2010], ostatni sposób immobilizacji enzymów będzie prawdopodobnie zyskiwał na znaczeniu.

Pułapkowanie w porowatych matrycach polega na mechanicznym zamknięciu enzymu w strukturze żelu. Biokatalizatory tego rodzaju przygotowuje się poprzez zmieszanie enzymu z ciekłym nośnikiem i indukowanie procesu żelowania. Zestalenie żelu wywołuje obniżenie temperatury (agar, agaroza, żelatyna), tworzenie mostków solnych z kationami wielowartościowymi (alginian), obniżenie pH (hydrożele krzemianowe), podwyższenie pH (żel chitozanowy), chemiczne sieciowanie (żele poliakrylamidowe) lub precypitację (polistyren) [Bickerstaff, 1997]. W przypadku nośników karagenianowych zestalenie następuje w odpowiednio niskiej temperaturze i w obecności kationów potasu, które dodatkowo muszą zostać wprowadzone do medium reakcyjnego [Iborra i wsp., 1997]. Pułapkowanie w żelach jest bardzo popularną metodą immobilizacji, ale nie pozbawioną wad: zestalony nośnik jest mało odporny na stres termiczny i mechaniczny, struktura żelu stanowi barierę dyfuzyjną dla substratów, szczególnie tych o dużych cząsteczkach, oraz produktów reakcji, natomiast aktywność biokatalizatora może maleć podczas procesu na skutek wypłukiwania enzymu z porów żelu [Bickerstaff, 1997]. Najczęściej stosowane nośniki to alginian wapnia [Fraser i Bickerstaff, 1997] i κ -karagenian [Iborra i wsp., 1997]. Polisacharydy te są niedrogie, procedura immobilizacji prosta i przebiegająca w łagodnych warunkach, a uzyskiwanym biokatalizatorom łatwo nadać kształt kulistych granul, sześciątów lub błon. Warto też wspomnieć o nowoczesnych nośnikach służących do pułapkowania enzymów: żelu krzemionkowym przygotowywanym techniką zol-żel oraz sieciowanym fotokatalitycznie poli(alkoholu winylowym) z ugrupowaniami styrylopirydynowymi (ang. styryl pyridinium groups) [Campás i Marty, 2006]. Układy te, ze względu na niewielką stabilność mechaniczną żelu, znajdują zastosowanie raczej jako biosensory, niż katalizatory w procesach biotechnologicznych.

Unieruchamianie za pomocą półprzepuszczalnych membran może być realizowane poprzez mikrokapsułkowanie, zamykanie enzymów w węzłach półprzepuszczalnych lub we wnętrzu reaktorów membranowych [Chmiel, 1998]. Półprzepuszczalne węże najczęściej wykonane są z pochodnych celulozy, nylonu, materiałów silikonowych itp. [Chmiel, 1998]. Mikrokapsułkę wokół enzymu można uformować przykładowo z azotanu celulozy, poliamidu lub mieszaniny lipidowo-poliamidowej. Ostatni materiał pozwala ponadto na zatrzymanie we wnętrzu półprzepuszczalnej otoczki kofaktorów enzymów.

W przypadku mikrokapsułkowania poważnym problemem jest wykazywana względem enzymów toksyczność niektórych odczynników i rozpuszczalników wykorzystywanych podczas immobilizacji [Chang, 2005]. Niekiedy enzymy zamyka się w mikrokapsułkach z alginianu wapnia, albo alginianu powleczonego warstwą poli-L-lizyny lub chitozanu. Techniki te są bardzo łagodne dla enzymów, ale utworzone mikrokapsułki zwykle uwalniają biokatalizator do środowiska [Gombotz i Fong Wee, 1998]. Półprzepuszczalną otoczkę stanowią także liposomy, a w przypadku enzymów wewnątrzkomórkowych ściana komórkowa i/lub błona cytoplazmatyczna komórki (aktywnej lub nieaktywnej) produkującej dany biokatalizator. Wadą mikrokapsulek jest to, że utrudniają wymianę masy z medium reakcyjnym. Enzymy są często zatrzymywane w reaktorach przepływowych w przestrzeni pomiędzy dwiema membranami o porach mniejszych w porównaniu z wielkością enzymu. Biokatalizatory unieruchomione tym sposobem niejednokrotnie szybciej tracą aktywność, niż te związane z nierozpuszczalnym nośnikiem [Albayrak i Yang, 2002; Mayer i wsp., 2010].

Unieruchamianie enzymów bez użycia nierozpuszczalnej matrycy polega na otrzymywaniu kryształów lub agregatów biokatalizatora i poddawaniu ich następnie działaniu czynnika sieciującego. Ze względu na brak nośnika, biokatalizatory takie są mniej kosztowne i wykazują znacznie wyższą aktywność w odniesieniu do jednostki masy, niż enzymy immobilizowane innymi metodami [Roy i Abraham, 2004; Sheldon i wsp., 2006]. Podejmowano również próby sieciowania enzymów bezpośrednio w roztworze (CLEs, ang. cross-linked enzymes). Uzyskane w ten sposób biokatalizatory były jednak niestabilne, a sama procedura immobilizacji wymagała szczegółowej optymalizacji i powodowała znaczną utratę aktywności enzymu [Roessl i wsp., 2010; Sheldon i wsp., 2006].

Otrzymywanie sieciowanych krystalicznych enzymów (CLECs; ang. cross-linked enzyme crystals) jest techniką bardzo wymagającą, przy czym największe wyzwanie stanowi przygotowanie kryształów. W tym procesie konieczne jest stosowanie enzymów o wysokim stopniu czystości (powyżej 90%), a także zoptymalizowanie jego parametrów, takich jak: stężenie i rodzaj czynnika precypitującego (sole nieorganiczne, sole organiczne, glikol polietylenowy), stężenie enzymu, rodzaj buforu, pH i temperatura, pod kątem najodpowiedniejszego kształtu i wielkości uzyskiwanych kryształów. Sieciowanie stabilizuje kryształy biokatalizatora. Powszechnie stosowanym czynnikiem sieciującym jest aldehyd glutarowy. Rzadziej wykorzystuje się glioksal, 1,4-butanodial, etylenodiaminę, heksaetylenodiaminę i inne [Roy i Abraham, 2004]. CLECs, w porównaniu z wolnymi enzymami, charakteryzują się większą selektywnością, dłużej zachowują aktywność w podwyższonej temperaturze i w obecności rozpuszczalników organicznych, są odporniejsze na działanie proteaz oraz wykazują stosunkowo dobrą stabilność mechaniczną [Roy i Abraham, 2004].

Agregację cząsteczek enzymów prowadzi się najczęściej za pomocą siarczanu amonu, glikolu polietylenowego i niektórych rozpuszczalników organicznych (np. alkohol tert-butyłowy). Podstawowym

czynnikiem sieciującym, podobnie jak w przypadku CLECs, jest aldehyd glutarowy. Substancję tą zastępuje się polialdehydem dekstranowym (polimerem otrzymanym w wyniku oksydacji dekstranu), gdy enzym sieciowany aldehydem glutarowym traci aktywność katalityczną. Biokatalizatory tego typu nazywane są CLEAs (ang. cross-linked enzyme aggregates). Wytwarzanie CLEAs zwykle nie powoduje obniżenia aktywności katalitycznej enzymów. Co więcej, jest niedrogi, łatwy do optymalizacji i, w przeciwieństwie do technologii CLECs, nie wymaga stosowania bardzo czystych enzymów. Umożliwia zatem otrzymywanie heteroagregatów (tzw. Combi-CLEAs), w skład których wchodzi więcej niż jeden enzym i wykazujących kilka różnych aktywności enzymatycznych jednocześnie. Wadą CLEAs jest ich ograniczona stabilność mechaniczna, której próbuje się przeciwdziałać poprzez mikrokapsułkowanie agregatów [Roessl i wsp., 2010]. Należy też nadmienić, że badana jest możliwość wprowadzenia metodami inżynierii genetycznej do struktury enzymu różnorodnych domen peptydowych, zwiększających podatność zmodyfikowanego enzymu na krystalizację lub autoagregację [Roessl i wsp., 2010; Roy i Abraham, 2004].

Wielość i różnorodność metod immobilizacji wskazuje, że nie istnieje jedna uniwersalna technika unieruchamiania enzymów, sprawdzająca się w każdym procesie biotechnologicznym. Dlatego przemysłowy wybór dogodnej techniki immobilizacji i optymalizacja warunków wiązania enzymu z nośnikiem jest podstawowym czynnikiem determinującym aktywność, stabilność i przydatność biokatalizatora w danym procesie.

W literaturze naukowej znaleźć można przykłady otrzymywania połączeń glikozydowych za pomocą enzymów unieruchomionych na nośnikach. Niewielki spadek wydajności syntezy galaktooligosacharydów w stosunku do wolnego enzymu stwierdzono w przypadku β -galaktozydazy z *Aspergillus niger* immobilizowanej na żywicy jonowymiennej [Prensil i wsp., 1987]. Powyższego efektu nie odnotowano podczas syntezy galaktooligosacharydów z laktozy z udziałem β -galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* unieruchomionej na tkaninie bawełnianej [Albayrak i Yang, 2002], ani w trakcie otrzymywania N-acetylolaktozoaminy za pomocą immobilizowanej na Eupergicie C β -galaktozydazy z *Bacillus circulans* [Hernaiz i Crout, 2000]. Unieruchomiona β -galaktozydaza z *B. circulans* wykazywała większą efektywność i regioselektywność w porównaniu z wolnym enzymem. Podobnie w przypadku β -glukozydazy z migdała, unieruchomionej za pośrednictwem aldehydu glutarowego na albuminie, nie tylko nie stwierdzono negatywnego wpływu immobilizacji na wydajność syntezy, ale wręcz zaobserwowano znaczne polepszenie aktywności syntetycznej w porównaniu z wolnym enzymem [Ravet i wsp., 1993]. Na uwagę zasługuje też niecodzienna strategia zastosowana podczas otrzymywania tGOS z laktozy za pomocą β -galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* [Chen i wsp., 2001]. Biokatalizator uwięziono w odwrrotnych micelach AOT/izooktanu, co pozwoliło uzyskać większą wydajność syntezy oligosacharydów w porównaniu z przemianą prowadzoną w środowisku wodnym.

3.2. Wolne komórki

Jednym z wariantów unieruchamiania enzymów jest zamykanie ich w otoczkach z membran półprzepuszczalnych. W wielu przypadkach rolę takiej membrany pełnić może błona cytoplazmatyczna komórki, w której występuje dany enzym [Chmiel, 1998]. Szczególnie przydatne jako biokatalizatory komórkowe są bakterie oraz drożdże, które można selekcjonować pod kątem pożądanej aktywności enzymatycznej i/lub modulować ich metabolizm za pomocą zmian warunków hodowli, a także poprzez manipulacje genetyczne wprowadzać do ich wnętrza obce enzymy a nawet całe układy enzymatyczne.

Zastosowanie komórek drobnoustrojów do katalizowania bioprocessów nie jest nowością, bowiem już najwcześniejsze przemiany biotechnologiczne, takie jak fermentowanie mleka, ciasta, surowców roślinnych, wytwarzanie piwa czy wina, zachodziły dzięki aktywności metabolicznej żywych mikroorganizmów. Współcześnie wykorzystywany jest również potencjał katalityczny jednego lub kilku enzymów występujących wewnątrz komórek drobnoustrojów. Biokatalizatory komórkowe zyskują coraz większe znaczenie, ze względu na możliwość prowadzenia za ich pośrednictwem wieloetapowych transformacji, brak konieczności regeneracji kofaktorów, obniżenie kosztów procesów związane z pominięciem etapu izolacji i oczyszczania wybranego enzymu, a także, w wielu przypadkach, brak konieczności podtrzymywania aktywności życiowej komórek [Klibanov, 1983]. Enzymy pozostające w naturalnym środowisku wewnątrz komórki posiadają często większą stabilność, niż czyste enzymy, ponieważ są w mniejszym stopniu narażone na stres oksydacyjny oraz działanie nieprzyjanych warunków otoczenia. Trudności związane ze stosowaniem całych komórek wynikają przede wszystkim z ograniczonego transportu masy przez barierę ściany i błony komórkowej, powstawania licznych produktów ubocznych, niebezpieczeństwa zanieczyszczeń mikrobiologicznych oraz lizy komórek [Klibanov, 1983]. Problemowi wymiany masy można przeciwdziałać poprzez permeabilizację komórek [Felix, 1982], a także konstruowanie układów nadekspresji powodujących wydzielanie rekombinantowych enzymów na zewnątrz komórki (np.: wydzielanie rekombinantowej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* przez komórki *Pichia pastoris* [Wanarska, 2005] lub glukoamylazy z *Arxula adenivorans* przez *Kluyveromyces lactis* [Salani i Bianchi, 2006]) lub zakotwiczenie enzymów na powierzchni komórek gospodarzy [Fujita i wsp., 2002; Ryckaert i wsp., 2005]. Modyfikacje genetyczne poszerzają również spektrum możliwości wykorzystania komórek mikroorganizmów. Przykłady nowych zastosowań wolnych komórek bakterii, drożdży oraz grzybów przedstawiono w tabeli 3.1.

3.3. Immobilizowane komórki

Unieruchomione komórki, podobnie jak unieruchomione enzymy, pozwalają na prowadzenie procesu biotechnologicznego w sposób ciągły oraz wielokrotne wykorzystanie tak przygotowanego biokatalizatora. Namnażanie komórek wewnątrz nośnika prowadzi do zwiększenia ich gęstości

w mieszaniu reakcyjnej, co zwiększa szybkość reakcji i poprawia produktywność złoza, a to z kolei umożliwia zmniejszenie rozmiaru reaktorów i ułatwia kontrolę bioprocessu. Immobilizacja upraszcza separację produktu od biokatalizatora, zapobiega wypłukiwaniu komórek z wnętrza reaktora, zapewnia lepszą stabilność genetyczną mikroorganizmom rekombinowanym, chroni komórki przed uszkodzeniem mechanicznym [Groboillot i wsp., 1994; Kolot, 1981 a; Willaert i Baron, 1996] oraz w przypadku nośników krzemionkowych zabezpiecza komórki podczas długotrwałego przechowywania w łagodnych warunkach, bez konieczności zamrażania czy liofilizacji [Alvarez i wsp., 2007; Desimone i wsp., 2006]. Immobilizowane biokatalizatory nie są jednak wolne od wad. Związanie ze złożem utrudnia wymianę masy pomiędzy komórką a środowiskiem reakcji. Ograniczenia te zależą od zastosowanej metody immobilizacji (w szczególności pułapkowania i mikrokapsułkowania), typu, struktury i wielkości ziaren nośnika, stężenia komórek w nośniku oraz charakterystyki hydrodynamicznej prowadzonego procesu [Groboillot i wsp., 1994]. Nieefektywny transport masy może skutkować obniżeniem wydajności biokonwersji, zmianami w morfologii, fizjologii oraz metabolizmie mikroorganizmów, a także nierównomiernym namnażaniem się komórek wewnątrz złoza [Groboillot i wsp., 1994]. Z kolei nadmierny wzrost drobnoustrojów, jak również niewystarczająca wytrzymałość mechaniczna i chemiczna nośnika, mogą prowadzić do jego zniszczenia i uwolnienia komórek do środowiska reakcji. Zbyt wysoki koszt złoza lub procedury immobilizacji może uczynić biokatalizator nieprzydatnym do stosowania w dużej skali [Willaert i Baron, 1996]. Pomimo wymienionych ograniczeń, unieruchomione komórki drobnoustrojów znajdują coraz więcej rozmaitych zastosowań (Tabela 3.2.).

„Rusztowanie” odpowiednie dla immobilizacji drobnoustrojów powinna cechować zdolność wiązania dużej ilości komórek, znaczna porowatość, odporność na działanie mikroorganizmów, stabilność w podwyższonej temperaturze (właściwość niezbędna podczas jałowienia nośnika) i przy podwyższonym ciśnieniu, stabilność w pH, w którym przebiega proces, stosunkowo niska cena oraz możliwość regeneracji. W przypadku przemian wymagających zachowania żywotności komórek, nośnik musi być nietoksyczny dla drobnoustrojów i nie może zmieniać ich metabolizmu [Kolot, 1981 a]. Znane są jednak przykłady stosowania szkodliwej dla komórek metody pułapkowania w żelu poliakrylamidowym [Hamachander i wsp., 2001; Manolov i wsp., 1995]. Ponieważ osadzanie komórek na różnorodnych złożach powodują te same rodzaje interakcji, co w przypadku unieruchamiania enzymów, w badaniach dotyczących immobilizowanych komórek wykorzystywane są zwykle jednakowe nośniki (Rysunek 3.1.). Niekiedy zastosowanie znajdują również nietypowe materiały, na przykład: żel glutenowy [Chien i wsp., 2001], wełna naturalna [Krastanov, 1997], przędza bawełniana pokryta polietylenoiminą [Melo i D'Souza, 1999], tkanina poliestrowa [Koziarz i Yamazaki, 1998], włóknina poliestrowa i pianka celulozowa [Yokoi i wsp., 1997], pianka poliwinylformolowa [Doronina

i wsp., 2006], membrana poliakrylamidowa i polisulfonowa aktywowana formaldehydem [Dobrevá i wsp., 1998] i wiele innych [Willaert i Baron, 1996].

Najczęściej stosowaną metodą unieruchamiania komórek jest pułapkowanie w żelach, szczególnie alginianowych i karagenowych. Wymienione polimery są nietoksyczne, niedrogie, stosunkowo łatwo nadać im wygodną formę kulistych granul oraz zostały dopuszczone do stosowania w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Pułapkowanie pozwala uzyskać bardzo wysoką gęstość komórek wewnątrz matrycy, ogranicza jednak transport masy pomiędzy komórką a medium reakcyjnym, a same nośniki posiadają zwykle niewielką wytrzymałość mechaniczną. Mogą ponadto uwalniać unieruchomione komórki do środowiska [Groboillot i wsp., 1994; Willaert i Baron, 1996].

Wśród metod immobilizacji powierzchniowej największe znaczenie w odniesieniu do unieruchamiania mikroorganizmów mają techniki adsorpcyjne [Kolot, 1981 a, b]. Ostatnio szczególnie chętnie stosowanym przez badaczy nośnikiem jest pianka poliuretanowa [de Ory i wsp., 2006]. W jej strukturze komórki zatrzymywane są jednocześnie w wyniku adsorpcji, agregacji we wgłębieniach oraz utrzymywania się w obszarach, gdzie przepływ medium reakcyjnego jest silnie ograniczony [Willaert i Baron, 1996]. Gęstość komórek unieruchomionych na tym nośniku jest mniejsza, niż wewnątrz żeli, ale pianka poliuretanowa charakteryzuje się większą stabilnością mechaniczną oraz nie zatrzymuje w porach gazowych metabolitów komórek. Kowalencyjne łączenie komórek z nierozpuszczalnymi matrycami jest techniką stosowaną rzadziej, co wynika z budowy chemicznej ścian i błon komórkowych (głównie fosfolipidy, glikolipidy oraz sacharydy, niewielka ilość białek) oraz z toksycznego działania odczynników wiążących na komórki. Do unieruchamiania komórek na powierzchni nośników wykorzystuje się coraz częściej specyficzne oddziaływania. Taką możliwość stwarza eksponowanie na powierzchni rekombinowanych drobnoustrojów domen silnie wiążących się do celulozy (CBD), wprowadzanych do komórek technikami inżynierii genetycznej [np.: Kylä-Nikkilä i wsp., 2010; Lehtiö i wsp., 2001; Wang i wsp., 2001]. Z kolei na nośnikach o powierzchni modyfikowanej konkanawaliną A efektywnemu unieruchomieniu ulegają komórki drożdży, których ściana komórkowa bogata jest w mannany specyficznie oddziałujące z wymienioną lektyną [Ramakrishna i Prakasham, 1999]. Należy jednak mieć na uwadze, że żadna z metod immobilizacji komórek na powierzchni nie zapobiega zjawisku uwalniania ich do środowiska [Willaert i Baron, 1996].

Barierę oddzielającą komórki od medium reakcyjnego stanowią również membrany półprzepuszczalne. Warianty tej metody obejmują zamykanie komórek w przestrzeni pomiędzy dwiema membranami np. w reaktorach membranowych, formowane półprzepuszczalnej otoczki naokoło komórek bezpośrednio podczas immobilizacji (mikrokapsułkowanie) lub unieruchamianie komórek w jednej z dwóch niemieszających się substancji (na przykład: dekstran/woda, poli(glikol etylenowy)/woda, poli(glikol etylenowy)/dekstran), przy czym biotransformacja przebiega w warstewce na granicy faz

[Willaert i Baron, 1996]. Bardzo popularna technika mikrokapsułkowania polega na pułapkowaniu komórek w alginianie wapnia, powlekanii granul warstewką chitozanu lub poli-L-lizyny, następnie warstewką alginianu sodu, a na końcu rozpuszczaniu żelu alginianowego za pomocą cytrynianów, fosforanów lub EDTA. Mikrokapsułki uzyskuje się także wkraplając zawiesinę komórek w chlorku wapnia do wodnego roztworu alginianu sodu [Chang, 2005; Orive i wsp., 2006; Park i Chang, 2000]. Poważnym problemem w przypadku mikrokapsułkowania jest wykazywana względem komórek toksyczność niektórych odczynników wykorzystywanych podczas immobilizacji [Park i Chang, 2000]. Membrany półprzepuszczalne stosunkowo efektywnie przeciwdziałają wyciekaniu komórek do otoczenia, ale utrudniają wymianę masy z medium reakcyjnym [Willaert i Baron, 1996].

Unieruchamianie komórek bez użycia odrębnego nośnika polega na samoczynnej lub indukowanej odczynnikami chemicznymi (na przykład: kationy wielowartościowe: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} ; polielektrolity: chitozan, poli-L-lizyna; aldehyd glutarowy, sproszkowany węgiel wapnia, tlenek żelaza i inne) agregacji komórek. Naturalną zdolność do formowania agregatów wykazują komórki niektórych gatunków bakterii, drożdży, grzybów, alg, a także roślin i zwierząt. Cechę tą można nadać komórkom metodami inżynierii genetycznej lub wzmocnić na drodze selekcji flokulujących szczepów [Willaert i Baron, 1996].

3.4. Permeabilizacja komórek

Ściana i błona komórkowa stanowią barierę oddzielającą wewnątrz komórki od otaczającego ją środowiska. Niektóre cząsteczki za sprawą mechanizmów transportu aktywnego mogą przenikać do komórki, transfer innych jest natomiast bardzo ograniczony lub wręcz niemożliwy. Na pokonanie tej przeszkody pozwala zastosowanie procedury permeabilizacji, podczas której następuje naruszenie struktury błony cytoplazmatycznej i/lub ściany komórkowej, ale nie dochodzi do lizy komórki czy zniszczenia układów wewnątrzkomórkowych [Felix, 1982].

Komórki ulegają permeabilizacji pod wpływem szeregu czynników chemicznych lub fizycznych (Rysunek 3.2.). Permeabilizacji mogą być poddawane bakterie gramododatnie i gramujemne, drożdże, grzyby, algi, komórki roślinne i zwierzęce. Wybór metody permeabilizacji zależy przede wszystkim od budowy ściany i/lub błony komórkowej organizmu. W przypadku bakterii gramujemnych wiele uwagi poświęcono znalezieniu substancji powodujących naruszenie jedynie błony zewnętrznej drobnoustroju (na przykład: kwas mlekowy, kwas cytrynowy, EDTA, chitozan, polietylenoamina, niektóre detergenty i rozpuszczalniki organiczne) [Alakomi i wsp., 2000; Bansal-Mutalic i Gaikar, 2003; Cánovas i wsp., 2005; Helander i Mattila-Sandholm, 2000; Helander i wsp., 2001]. Odczynniki te są bowiem szczególnie przydatne podczas wykorzystywania aktywności lub pozyskiwania enzymów zlokalizowanych w przestrzeni peryplazmatycznej komórki [Bansal-Mutalic i Gaikar, 2003].

CEL PRACY

Rekombinantowa β -galaktozydaza z *Pyrococcus woesei* (Pw β gal) jest wysoce termostabilnym enzymem, wykazującym najwyższą aktywność hydrolityczną w temperaturze 93°C i pH 5,4 [Synowiecki i Maciuńska, 2002]. Dotychczas wykazano przydatność roztworów podczyszczonej Pw β gal lub enzymu unieruchomionego w żelu chitozanowym [Wanarska, 2005], na chitynie [Dąbrowski i wsp., 2000] lub żelu krzemionkowym modyfikowanym aminopropylotrietoksyilanem [Wołosowska, 2006], do katalizowania hydrolizy laktozy. Zaobserwowano również zdolność tego biokatalizatora do syntetyzowania oligosacharydów z laktozy [Wanarska, 2005]. Celem obecnej pracy było zbadanie możliwości zastosowania Pw β gal do katalizowania reakcji odwrotnej hydrolizy i/lub transglikozylacji. Ponadto, podjęto próbę opracowania możliwie najmniej kosztownego sposobu immobilizacji termostabilnego enzymu oraz porównanie aktywności syntetycznej uzyskanego(ych) preparatu(ów) z aktywnością Pw β gal w roztworze.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

4. Materiały i metody

4.1. Szczepy mikrobiologiczne, podstawowe materiały i odczynniki

Mikroorganizmy

- *Escherichia coli* BL21(DE3) transformowana wektorem zawierającym gen termostabilnej β -galaktozydazy z hipertermofilnego archeona *Pyrococcus woesei*, wklonowanym za pośrednictwem miejsc rozpoznawanych przez restrykcyjne endonukleazy *KpnI* oraz *HindIII* do plazmidu pET-30LIC z sekwencją kodującą odporność na działanie kanamycyny [Synowiecki i Maciuńska, 2002]
- *Pichia pastoris* GS115, której genomowe DNA zostało zmodyfikowane DNA rekombinantowego plazmidu zawierającego gen termostabilnej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* (pGAPZ β -gal) [Wanarska, 2005]; ekspresja genu termofilnej β -galaktozydazy w tym układzie następowała konstytutywnie; szczep został zaprojektowany, przygotowany i udostępniony do badań przez dr inż. Martę Wanarską

Podłoża mikrobiologiczne

- podłoże LB (płynne): 10 g peptonu K, 5 g ekstraktu drożdżowego (BTL, Polska) oraz 10 g NaCl (POCH S.A., Polska) rozpuszczano w 1 dm³ wody destylowanej; pH podłoża doprowadzano do wartości 7,2 za pomocą 2 M roztworu NaOH
- podłoże YPD (płynne): 10 g peptonu K, 10 g ekstraktu drożdżowego rozpuszczano w 0,8 dm³ wody destylowanej; pH podłoża doprowadzano do wartości 6,0 za pomocą 1 M roztworu H₂SO₄; przed użyciem do pożywki dodawano 0,2 dm³ jałowego wodnego 20% (w/v) roztworu glukozy
- podłoża stałe LB i YPD zawierały dodatkowo 20 g agaru (BTL, Polska)
- kanamycyna (Fluka): wodny roztwór podstawowy 50 mg/cm³
- zeocyna 100 mg/cm³ (Invitrogen)

Podłoża mikrobiologiczne oraz roztwór glukozy autoklawowano (121°C, 20 min), natomiast roztwory antybiotyków sączono przez jałowe filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,22 μ m (Whatman).

Substraty do reakcji enzymatycznych: o-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozyd, laktoza (Fluka), fruktoza (Ubichem, Wielka Brytania)

Wzorce sacharydów do HPLC: glukoza, galaktoza, laktoza, laktuloza (Fluka), fruktoza (Ubichem, Wielka Brytania)

Nośnik enzymu i komórek: alginian sodu (Aldrich), chlorek wapnia (POCH S.A., Polska)

Substancje permeabilizujące: etanol, izopropanol, glicyna, kwas mlekowy (POCH S.A., Polska), kwas cytrynowy (Standard, Polska)

Składniki buforów: kwas octowy 99,5%, octan sodu, dwuzasadowy fosforan (V) sodu, jednozasadowy fosforan (V) sodu, kwas borowy, czteroboran sodowy, kwas fosforowy (V) (POCH S.A., Polska)

Pozostałe odczynniki: 1-N-fenylonaftyloamina, akrylamid, N,N'-metylenobisakrylamid, ditiotreitrol, jodek propidyny, nadsiarczan amonu, SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu), TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina), tlenek glinu typ A-5, Trizma Base (Sigma), azotan srebra, tiosiarczan sodu, węglan sodu (POCH S.A., Polska), acetonitryl, żel krzemionkowy SiGel 60H (Merck Sp. z o.o., Polska), Coomassie Brilliant Blue G250 i R250 (Fluka),

4.2. Aparatura

- zestaw HPLC LaChrom (Merck Hitachi, Japonia): RI Detector L-7490, Interface D-7000, Pump L-7100, Autosampler L-7200, Column Oven L-7300
- łaźnia wodna ThermoHaake DC 10, łaźnia glicerynowa ThermoHaake DC 30 (ThermoHaake, Niemcy)
- wstrząsarka wodna Elpin+ typ 357 (Elpin Plus S.C., Polska)
- wstrząsarka powietrzna (Forma Scientific Inc., USA)
- spektrofotometr Helios Alpha (Thermo Spectronic, Anglia)
- spektrofluorymetr Perkin-Elmer LS-5B (Perkin-Elmer, USA)
- wirówki laboratoryjne: Eppendorf 5415 D (Eppendorf, Niemcy), MPW-350R (MPW Medical Instruments, Polska), Sigma 6K15 (Sigma)
- suszarka laboratoryjna z regulacją temperatury (Binder)

4.3. Postępowanie doświadczalne

4.3.1. Przygotowanie komórek *Escherichia coli* i *Pichia pastoris*

Komórki rekombinowanej *Escherichia coli* wysiewano na płytce z jałowym podłożem stałym LB z kanamycyną (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Pojedynczą kolonią zaszczepiano 100 cm^3 jałowego płynnego podłoża LB z kanamycyną (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) i inkubowano przez noc w 37°C bez dodatkowego napowietrzania w termostatowanej wstrząsarce powietrznej (180 cykli/min). 10 cm^3 hodowli przenoszono w jałowych warunkach do 1 dm^3 podłoża LB bez kanamycyny i inkubowano w opisanych powyżej warunkach przez 24 godziny.

Komórki rekombinowanej *Pichia pastoris* wysiewano na płytce z jałowym podłożem stałym YPD z zeocyną (100 µg/cm³) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30°C. Pojedynczą kolonią zaszczipiano 100 cm³ jałowego płynnego podłoża YPD z zeocyną (100 µg/cm³) i inkubowano przez noc w 30°C bez dodatkowego napowietrzania w termostатовanej wstrząsarce powietrznej (180 cykli/min). 10 cm³ hodowli przenoszono w jałowych warunkach do 1 dm³ podłoża YPD bez zeocyny i inkubowano w opisanych powyżej warunkach przez 24 godziny.

Biomasę bakteryjną/drożdżową wirowano (5000×g, 15 min), przemywano solą fizjologiczną (0,9% w/v NaCl) lub odpowiednim buforem i ponownie wirowano (8800×g, 15 min).

4.3.2. Izolacja i oczyszczanie termofilnej β-galaktozydazy

Rekombinantową β-galaktozydazę z *Pyrococcus woesei* (Pwβgal) izolowano i oczyszczano zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Synowieckiego i Maciuńską [2002].

1 g biomasy bakteryjnej zamrożonej w temperaturze -20°C rozcierano z 2 g tlenku glinu (Alumina A5) w chłodzonym moździerzu przez 15 min, dodając stopniowo 7 cm³ 10 mM buforu fosforanowego o pH 7,2 zawierającego 1 mM ditiotreitól. Otrzymany homogenat wirowano (8800 × g, 15 min, 4°C), a uzyskany ekstrakt bezkomórkowy ogrzewano w łaźni wodnej (15 min, 85°C) w celu strącenia termolabilnych białek mezofilnego gospodarza, które oddzielano przez wirowanie (8800×g, 15 min, 4°C). Pozostającą w supernatancie termostabilną β-galaktozydazę strącano, dodając powoli i ciągle mieszając aceton (1:2 v/v). Po około 15 min enzym oddzielano na nuczyci filtracyjnej ze spiekami porcelanowym S3 pod obniżonym ciśnieniem, przemywano zimnym acetonem (-5°C) i suszono w temperaturze otoczenia. Preparat przechowywano w szczelnie zamkniętym pojemniku w temperaturze 4°C.

4.3.3. Permeabilizacja komórek *E. coli* i *P. pastoris* oraz określanie zmian przepuszczalności błon komórkowych

Błonę cytoplazmatyczną komórek drożdży *Pichia pastoris* oraz błonę cytoplazmatyczną i/lub zewnętrzną komórek bakterii *Escherichia coli* permeabilizowano metodą chemiczną, stosując: etanol i izopropanol (10–75% v/v) w przypadku *P. pastoris* oraz etanol, izopropanol (5-50% v/v), kwas cytrynowy, kwas mlekowy (1-20 mM) lub glicynę (0,5-5% w/v) w przypadku *E. coli*. Działanie substancji permeabilizujących porównano z wpływem podwyższonej temperatury (50-100°C) na integralność błon komórek *E. coli* i *P. pastoris*. Przy wyborze substancji permeabilizujących, ich stężeń, temperatury i czasu działania kierowano się wynikami prac innych autorów [Cánovas i wsp., 2005].

1 cm³ zawiesiny komórek o stężeniu 50 mg/cm³ inkubowano przez 15 min w **a**) wodnym roztworze danego czynnika permeabilizującego w temperaturze otoczenia lub **b**) soli fizjologicznej w danej temperaturze, następnie wirowano (6000×g, 3 min), przemywano solą fizjologiczną, ponownie wirowano (6000×g, 3 min) i zawieszano w 1 cm³ soli fizjologicznej. Tak przygotowane komórki stosowano do dalszych oznaczeń.

Zawiesinę permeabilizowanych lub traktowanych termicznie komórek rozcieńczano odpowiednio 50 mM buforem octanowym o pH 5,4 i oznaczano aktywność β-galaktozydazy wykazywaną przez komórki.

W celu określenia ilości białka wyciekającego z komórek po permeabilizacji lub działaniu temperatury, zawiesinę komórek inkubowano przez 2 godz we wstrząsarce powietrznej (temperatura otoczenia, 150 cykli/min), po czym wirowano (10000×g, 3 min) i w supernatancie metodą Bradford oznaczano stężenie białka (podrozdział 4.3.6.3.).

Zmiany przepuszczalności błony cytoplazmatycznej komórek bakteryjnych i drożdżowych oznaczano na podstawie wzrostu intensywności fluorescencji jodku propidyny (PI) przenikającego przez naruszoną błonę i interkalującego do kwasów nukleinowych we wnętrzu komórek. 0,05 cm³ zawiesiny komórek (5 mg/cm³), 0,45 cm³ soli fizjologicznej oraz 0,5 cm³ 30 μM jodku propidyny (3 mM roztwór podstawowy PI w etanolu rozcieńczano solą fizjologiczną do stężenia 30 μM) mieszano, inkubowano w ciemności przez 15 min i mierzono fluorescencję mieszaniny przy długości fali emisji równej 635 nm (długość fali wzbudzenia 485 nm, szerokość szczeliny 5 nm) [Gänzle i Vogel, 2001].

Zmniejszenie integralności błony zewnętrznej komórek *E. coli* oznaczano na podstawie wzrostu intensywności fluorescencji 1-N-fenylonaftyloaminy (NPN) wchodzącej w interakcje z łańcuchami lipidowymi lipopolisacharydów i fosfolipidów uszkodzonej błony [Cánovas i wsp., 2005; Helander i Matilla-Sandholm, 2000]. 0,02 cm³ zawiesiny komórek (2,5 mg/cm³), 0,48 cm³ soli fizjologicznej oraz 0,5 cm³ 20 μM 1-N-naftylofenyloaminy (10 mM roztwór podstawowy NPN w etanolu rozcieńczano solą fizjologiczną do stężenia 20 μM) mieszano i natychmiast mierzono fluorescencję mieszaniny przy długości fali emisji równej 420 nm, przy czym długość fali wzbudzenia wynosiła 340 nm, a szerokość szczeliny 2,5 nm [Gänzle i Vogel, 2001].

Wszystkie oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki porównywano z wartościami otrzymanymi dla zawiesiny komórek nie poddanej permeabilizacji ani działaniu temperatury.

4.3.4. Immobilizacja preparatu β -galaktozydazy z *P. woesei* oraz komórek rekombinowanej *E. coli*

4.3.4.1. Pułapkowanie enzymu lub komórek w alginianie wapnia

Do 10 cm³ 4,5% roztworu alginianu sodu w soli fizjologicznej dodawano 5 cm³ roztworu enzymu/zawiesiny bakterii w soli fizjologicznej. Mieszaninę wkraplano za pomocą strzykawki z igłą o średnicy wewnętrznej 0,5 mm do 2% w/v CaCl₂. Otrzymane w ten sposób granule utwardzano w w/w roztworze przez 4 godz w temperaturze otoczenia. Preparat następnie sączono, przemywano wodą destylowaną oraz solą fizjologiczną i przechowywano w soli fizjologicznej w temperaturze 4°C. Bezpośrednio przed użyciem preparat płukano wodą destylowaną oraz 50 mM buforem octanowym o pH 5,4, rozkładano cienką warstwą na bibule i osuszano przez 15 min w temperaturze otoczenia.

4.3.4.2. Optymalizacja warunków unieruchamiania enzymu oraz komórek

Dobierając dogodne warunki immobilizacji podczyszczonej Pw β gal lub komórek *Escherichia coli* z Pw β gal, badano wpływ zmiennych parametrów unieruchamiania na aktywność β -galaktozydazy wykazywaną przez uzyskane preparaty. Warunki unieruchamiania enzymu i bakterii optymalizowano uwzględniając:

- procentowość alginianu wapnia (1–5% alginian wapnia; 2% w/v CaCl₂; 30 mg/cm³ komórek lub 0,5 mg/cm³ enzymu; 4 godz),
- stężenie roztworu chlorku wapnia (0,5–5% w/v CaCl₂; 2% alginian wapnia; 30 mg/cm³ komórek lub 0,5 mg/cm³ enzymu; 4 godz),
- czas utwardzania granul złoża (2–12 godz; 3% alginian wapnia; 2% w/v CaCl₂; 30 mg/cm³ komórek lub 0,5 mg/cm³ enzymu),
- wielkość granul złoża (średnica granuli: 2–5 mm; 3% alginian wapnia; 2% w/v CaCl₂; 30 mg/cm³ komórek lub 0,5 mg/cm³ enzymu; 4 godz); średnicę granul mierzono za pomocą suwmiarki z wyświetlaczem cyfrowym; granule różnej wielkości otrzymywano wkraplając mieszaninę alginianu sodu i enzymu/bakterii przez igły o średnicach wewnętrznych równych 0,5–2 mm,
- stężenie roztworu enzymu lub zawiesiny bakterii w płynnym alginianie sodu (1–250 mg/cm³ komórek lub 0,25–6 mg/cm³ enzymu; 3% alginian wapnia; 2% w/v CaCl₂; 4 godz).

4.3.4.3. Modyfikacje alginianowego nośnika enzymu lub komórek *E. coli*

Zbadano także możliwość polepszenia właściwości mechanicznych złoża alginianowego w wyniku modyfikacji jego składu/sposobu immobilizacji. Zaproponowano następujące modyfikacje:

- Pw β gal unieruchomiono w 5% alginianie wapnia,
- Pw β gal unieruchomiono w 5% alginianie wapnia, po czym granule utwardzano w 2% w/v CaCl₂ zawierającym 2% aldehydu glutarowego,

- komórki *E. coli* unieruchomiono w 5% alginianie wapnia,
 - komórki *E. coli* unieruchomiono w 3% alginianie wapnia, ale medium reakcyjne wzbogacono w 1 mM CaCl₂,
 - komórki *E. coli* unieruchomiono w 3% alginianie wapnia; granule następnie pokryto warstewką chitozanu (0,8% w/v roztwór chitozanu w 0,5% kwasie octowym; 3 godz), a chitozan usieciowano aldehydem glutarowym (2% wodny roztwór aldehydu glutarowego, 3 godz),
 - komórki *E. coli* unieruchomiono w nośniku alginianowo-chitozanowym; zawiesinę bakterii w 3% alginianie sodu wkraplano do 0,8% w/v roztworu chitozanu w 0,5% kwasie octowym zawierającego 2% w/v CaCl₂; po 5 godz granule przenoszono do 2% aldehydu glutarowego i sieciowano przez 2 godz,
 - komórki *E. coli* unieruchomiono w nośniku zawierającym 3% alginianu wapnia i 2% żelu krzemionkowego [Konsoula i Liakopoulou-Kyriakides, 2006],
 - komórki *E. coli* unieruchomiono w nośniku zawierającym 3% alginianu wapnia i 2% tlenku glinu.
- Stabilność uzyskanych złóż sprawdzono poprzez ich wielokrotne wykorzystanie w reakcji syntezy laktulozy (podrozdział 4.3.7.3.).

4.3.5. Oznaczanie aktywności β-galaktozydazy wykazywanej przez różne formy Pwβgal

Aktywność β-galaktozydazy oznaczano zmodyfikowaną metodą Craven'a [1965] określając spektrofotometrycznie ilość *o*-nitrofenolu uwalnianego podczas hydrolizy *o*-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozydu (oNPβGal) w wybranym buforze.

2,5 cm³ 5 mM roztworu oNPβGal w 50 mM buforze octanowym o pH 5,4 umieszczano w zamykanych probówkach szklanych, preinkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 70°C przez 2 min, po czym dodawano 0,5 cm³ roztworu enzymu lub zawiesiny komórek i prowadzono reakcję przez 3 min w 70°C. Hydrolizę zatrzymywano przez schłodzenie próbek w wodzie z lodem i dodanie 1 cm³ 1 M roztworu Na₂CO₃. W przypadku zawiesiny komórek mieszaninę reakcyjną wirowano (10000×g, 1 min) w celu oddzielenia komórek od hydrolizatu. Pomiaru absorpcji próbek dokonywano przy długości fali 420 nm względem próby odniesienia, zawierającej 0,5 cm³ 50 mM buforu octanowego zamiast roztworu enzymu lub zawiesiny bakterii.

Aktywność hydrolityczną preparatów immobilizowanego enzymu lub komórek względem oNPβGal oznaczano w następujący sposób: 0,5 cm³ 50 mM buforu octanowego o pH 5,4 i 2,5 ml 5 mM roztworu oNPβGal w tym buforze preinkubowano w zakręcanych probówkach szklanych w termostatowanej wstrząsarce wodnej (70°C, 2 min), po czym dodawano porcję złoża o znanej masie (około 40 mg) i prowadzono reakcję przez 3 min (130 cykli/min, amplituda 4). W celu zatrzymania

reakcji próbki schładzano w wodzie z lodem. Bezpośrednio przed pomiarem absorpcji do próbek dodawano 1 cm³ 1 M Na₂CO₃, oddzielano granule złoża, a mieszaninę poreakcyjną wirowano (10000×g, 1 min). Pomiaru absorpcji próbek dokonywano przy długości fali promieniowania równej 420 nm, względem próby odniesienia, do której nie wprowadzano granul biokatalizatora.

Absorbancję roztworów przeliczano na stężenie *o*-nitrofenolu stosując molowy współczynnik absorpcji *o*-nitrofenolu wynoszący 4500 M⁻¹·cm⁻¹. Jako jednostkę aktywności β-galaktozydazy przyjęto masę biokatalizatora (enzymu, komórek *E. coli* lub *P. pastoris*, preparatu immobilizowanego enzymu lub komórek) konieczną do uwolnienia 1 μmola *o*-nitrofenolu z *o*NPβGal w czasie 1 min w opisanych warunkach reakcji. Aktywność β-galaktozydazy obliczano ze wzoru:

$$U/g = \frac{A_{420} \cdot v_p}{\varepsilon_{420} \cdot m \cdot t \cdot d} \times 10^6$$

gdzie:

A_{420} – absorbancja mieszaniny poreakcyjnej przy długości fali równej 420 nm

ε_{420} – molowy współczynnik absorpcji *o*-nitrofenolu (4500 M⁻¹cm⁻¹)

v_p – końcowa objętość próbki (4 cm³) [dm³]

m – masa enzymu/komórek bakteryjnych/granul złoża [g]

t – czas reakcji enzymatycznej [min]

d – grubość warstwy absorbującej promieniowanie (1 cm) [cm]

4.3.6. Porównanie właściwości różnych form Pwβgal

W celu porównania właściwości różnych postaci biokatalizatora (podczyszczonej rekombinantowej β-galaktozydazy z *P. woesei*, komórek *E. coli* lub *P. pastoris* z Pwβgal, immobilizowanego enzymu lub komórek), określono wpływ temperatury i pH środowiska na aktywność β-galaktozydazy wykazywaną przez każdą z form w reakcji z *o*NPβGal, a także termostabilność wolnego enzymu i komórek. W przypadku wolnych komórek *E. coli* i *P. pastoris* zbadano również ilość białka „wyciekającego” z komórek podczas 48-godzinnej inkubacji w podwyższonej temperaturze.

4.3.6.1. Wpływ temperatury i pH środowiska na aktywność β-galaktozydazy wykazywaną przez różne formy Pwβgal

Aktywność β-galaktozydazy oznaczano zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 4.3.5., modyfikując warunki reakcji w następujący sposób:

- temperatura reakcji: 50–105°C; pH 5,4 50 mM bufor octanowy; stała ilość biokatalizatora; czas reakcji 3 min,

- pH środowiska reakcji: pH 3–8; 70°C; stała ilość biokatalizatora; czas reakcji 3 min;
50 mM bufor Brittona i Robinsona w reakcjach katalizowanych przez wolny enzym/komórki,
50 mM bufor glicynowy (pH 3), 50 mM bufor octanowy (pH 4–6), 50 mM bufor boranowy
(pH 7–8) w reakcjach katalizowanych przez immobilizowany enzym/komórki.

4.3.6.2. Termostabilność biokatalizatorów

W oddzielnych probówkach Eppendorfa umieszczano 1 cm³ roztworu Pwβgal (10 mg/cm³)/zawiesiny komórek *E. coli* lub *P.pastoris* (10 mg/cm³) w 50 mM buforze octanowym pH 5,4 lub 1% w/v roztworze glukozy we wspomnianym buforze, i inkubowano w termostатовanej cieplarni laboratoryjnej w temperaturze 80 oraz 90°C przez 120 godzin. W określonych odstępach czasowych pobierano próbki biokatalizatorów, zawiesinę komórek wirowano (10000×g, 2 min) i zawieszano w 1 cm³ buforu. Roztwory enzymu lub zawiesinę komórek rozcieńczano odpowiednio 100 i 10 razy buforem i oznaczano aktywność β-galaktozydazy wykazywaną przez każdy z biokatalizatorów.

4.3.6.3. Oznaczenie ilości białka uwalnianego przez komórki *E. coli* i *P. pastoris* do środowiska

2,5 cm³ zawiesiny bakterii (100 mg/cm³) w 50 mM buforze octanowym o pH 5,4 umieszczano w oddzielnych zakręcanych szklanych probówkach i inkubowano w temperaturze 80°C w termostатовanej wstrząsarce wodnej (120 cykli/min, amplituda 3) przez 48 godzin. W określonych odstępach czasu pobierano próbki zawiesiny, wirowano (10000×g, 2 min) i oznaczano w supernatancie aktywność β-galaktozydazy (zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 4.3.5) oraz zawartość białka.

Zawartość białka oznaczano metodą Bradford [1976]. Do próbki szklanej przenoszono 0,2 cm³ supernatantu oraz 2 cm³ roztworu roboczego odczynnika Bradford. Zawartość próbki dokładnie mieszano i po upływie 5 min dokonywano pomiaru absorbancji mieszaniny przy λ = 595 nm względem próby odniesienia, zawierającej 0,2 cm³ buforu octanowego i 2 cm³ roztworu roboczego. Roztwór roboczy odczynnika Bradford przygotowywano przez zmieszanie 85 cm³ H₂O, 3 cm³ 95% etanolu, 6 cm³ 85% H₃PO₄ i 6 cm³ roztworu macierzystego odczynnika. Roztwór macierzysty otrzymywano przez rozpuszczenie 350 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 w 100 cm³ 95% etanolu i zakwaszenie 200 cm³ 85% H₃PO₄. Zawartość białka w próbkach obliczano z równania regresji krzywej wzorcowej sporządzonej według powyższej procedury dla albuminy osocza krwi bydlęcej (Sigma). Uzyskane wyniki odniesiono do całkowitej zawartości białka w komórkach. Wartość tą oszacowano poddając znaną masę komórek bakteryjnych/drożdżowych lizie zasadowej (2 M NaOH, 100°C, 5 min) [Cumming i Icton, 2001] i oznaczając w otrzymanym lizacie, po neutralizacji 2 M HCl, stężenie białka (metoda Bradford).

Białka uwolnione z komórek podczas inkubacji w 80°C porównano pod względem spektrum mas cząsteczkowych z białkami wyekstrahowanymi z komórek w wyniku ich dezintegracji z aluminą A5 (podrozdział 4.3.2.). Rozdział białek prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Białka po rozdziale barwiono azotanem srebra (podrozdział 4.3.6.4.).

4.3.6.4. Analiza elektroforetyczna białek

Białka wyekstrahowane z komórek bakteryjnych i drożdżowych badano metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Próbkę, po naniesieniu, wstępnie zagęszczano w żelu 5% [na 2 cm³ żelu: woda dejonizowana 1,4 cm³, 30% roztwór akrylamidów (na 100 cm³: akrylamid 29 g, N,N'-metylenobisakrylamid 1 g i woda) 0,33 cm³, 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,25 cm³, 10% SDS 0,02 cm³, 10% nadsiarazan amonu 0,02 cm³, TEMED 0,002 cm³], a właściwy rozdział elektroforetyczny prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym (na 5 cm³ żelu: woda dejonizowana 1,6 cm³, 30% roztwór akrylamidów 2 cm³, 1 M Tris-HCl pH 8,8 1,3 cm³, 10% SDS 0,05 cm³, 10% nadsiarazan amonu 0,05 cm³, TEMED 0,004 cm³) w buforze do elektroforezy (na 1 dm³ buforu: Trizma Base 3 g, glicyna 19 g, SDS 1 g, woda dejonizowana). Początkowo stosowano napięcie równe 70 V, które po osiągnięciu przez próbki granicy żelu zagęszczającego i rozdzielającego zwiększano do 150 V. Próbkę przed naniesieniem na żel mieszano z buforem do nanoszenia (na 5 cm³ buforu: woda dejonizowana 0,9 cm³, 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,6 cm³, 50% gliceryna 2,5 cm³, 10% siarczan dodecyłu 1 cm³, ditiotreitól 40 mg, błękit bromofenolowy 5 mg) w proporcji 2:1 v/v i ogrzewano w temperaturze 105°C przez 5 min. Po zakończeniu rozdzielania żel barwiono przez 1 godzinę roztworem Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue R 250 0,25 g, metanol 50 cm³, lodowaty kwas octowy 10 cm³, woda destylowana 40 cm³), a następnie odbarwiano przez 24 godziny, wymieniając dwukrotnie roztwór odbarwiający (metanol 20 cm³, lodowaty kwas octowy 10 cm³, woda destylowana 80 cm³).

Drugą stosowaną metodą wizualizacji elektroforegramu było barwienie srebrowe [Shevchenko i wsp., 1996]. Żel przemywano kolejno wodą destylowaną, wodnym roztworem 5% kwasu octowego i 50% metanolu (45 min), 50% metanolem (15 min), wodą dejonizowaną (15 min), 0,02% tiosiarczanem sodu (3 min), dwukrotnie wodą dejonizowaną (2×2 min), barwiono 0,15% roztworem azotanu srebra (40 min), ponownie dwukrotnie przemywano wodą dejonizowaną (2×2 min), wywoływano barwę 2% węglanem sodu (do chwili uzyskania pożądanego zabarwienia), po czym zatrzymywano barwienie poprzez przemycie 5% kwasem octowym (20 min). Żel przechowywano w wodnym roztworze 5% kwas octowego i 10% metanolu.

W badaniach stosowano wzorzec mas cząsteczkowych białek 14,4-116 kDa (Fermentas).

4.3.7. Zastosowanie rekombinantowej β -galaktozydazy z *P. woesei* do katalizowania reakcji transglikozylacji

4.3.7.1. Wykorzystanie różnych akceptorów reszty galaktozy w reakcji transglikozylacji

Badania prowadzono stosując 1 cm³ mieszaniny reakcyjnej zawierającej 1 U/cm³ wolnej Pw β gal, 10% w/v laktozy (donor reszty glikozylowej) i następujące akceptory reszty glikozylowej:

- arabinoza, fruktoza, galaktoza, glukoza, ksyloza, mannoza, mannitol, ryboza, sorboza lub sorbitol (5% w/v),
- celobioza, laktuloza, maltoza, sacharoza lub trehaloza (10% w/v),
- etanol, glikol etylenowy lub gliceryna (5% v/v).

Mieszaniny reakcyjne inkubowano w temperaturze 80°C przez 8 godz. Przeprowadzono również reakcje, w których jedynym substratem była laktoza lub laktuloza (10% w/v). Uzyskane hydrolizaty oczyszczano (podrozdział 4.3.8.1.) i analizowano chromatograficznie (HPLC; podrozdział 4.3.8.2.).

4.3.7.2. Synteza laktulozy

4,5 cm³ roztworu substratu w 50 mM buforze octanowym o pH 5,4 oraz 0,5 cm³ roztworu enzymu/zawiesiny komórek umieszczano w kolbie stożkowej 50 cm³ ze szlifem, i inkubowano w 70°C w termostatowanej wstrząsarce wodnej (120 cykli/min, amplituda 3) przez 4 godziny. Reakcję zatrzymywano przez oziębienie mieszaniny w wodzie z lodem. W przypadku biokatalizatorów immobilizowanych, do 5 cm³ substratu dodawano odważoną ilość złoża. Pozostałe parametry reakcji pozostawały bez zmian. Uzyskane mieszaniny poreakcyjne oczyszczano oraz analizowano jakościowo i ilościowo metodą HPLC. Warunki prowadzenia reakcji transglikozylacji optymalizowano uwzględniając wybrane parametry procesu, wyszczególnione w tabeli 4.1.

4.3.7.3. Wielokrotne wykorzystanie pojedynczej porcji biokatalizatora do otrzymywania laktulozy

0,5 cm³ zawiesiny komórek o stężeniu 80 mg/cm³ umieszczano w probówkach Eppendorfa, wirowano (10000×g, 1 min) i zawieszano w 1 cm³ substratu (10% w/v laktoza i 5% w/v fruktoza w 50 mM buforze octanowym o pH 5,4), uzyskując w ten sposób w mieszaninie reakcyjnej aktywność β -galaktozydazy równą 3,7 U/cm³. Probówki inkubowano w 80°C w termostatowanej wstrząsarce wodnej (120 cykli/min, amplituda 3) przez 2 lub 4 godziny, po czym wirowano (10000×g, 1 min) zachowując supernatant do analizy jakościowej i ilościowej. Pozostałość płukano 1 cm³ buforu octanowego, zawieszano w świeżej porcji substratu i poddawano kolejnej inkubacji. Analogicznie badano ilość białka uwalnianego przez komórki w każdym cyklu. W tym przypadku 1 cm³ zawiesiny komórek o stężeniu 80 mg/cm³ wirowano i zawieszano w 1 cm³ 50 mM buforu octanowego o pH 5,4.

W supernatancie uzyskanym po każdym 2 lub 4- godzinnym cyklu oznaczano zawartość białka (metoda Bradford) oraz aktywność β -galaktozydazy.

Porcję unieruchomionego enzymu/komórek, umożliwiającą uzyskanie aktywności β -galaktozydazy równej $1,5 \text{ U/cm}^3$, umieszczano w kolbce stożkowej 50 cm^3 ze szlifem zawierającej 5 cm^3 w/w substratu (10% w/v laktoza i 5% w/v fruktoza w 50 mM buforze octanowym o pH 5,4) i inkubowano w 60 lub 80°C w termostатовanej wstrząsarce wodnej (120 cykli/min, amplituda 3) przez 4 godz. Następnie granule złoża oddzielano, zachowując przesącz, przemywano wodą destylowaną i buforem octanowym, suszono na bibule przez 15 min i poddawano kolejnej inkubacji ze świeżym substratem.

4.3.7.4. Otrzymywanie *trans*-galaktooligosacharydów i laktulozy z serwatki

Syntezę tGOS z serwatki lub laktulozy z 4,5% w/v roztworu fruktozy w serwatce prowadzono przy użyciu wolnej i immobilizowanej Pw β gal, wolnych i immobilizowanych komórek rekombinowanej *E. coli* oraz wolnych komórek *P. pastoris*. We wszystkich przypadkach aktywność biokatalizatora w środowisku reakcji wynosiła 1 U/cm^3 , a temperatura reakcji 80°C . W ustalonych odstępach czasu pobierano próbki hydrolizatów, które oczyszczano i analizowano chromatograficznie.

Serwatkę przygotowano z mleka odtłuszczonego (Mleko Łaciate 0%, UHT, SM „Mlepol”, Grajewo). W celu usunięcia kazeiny mleko zakwaszono lodowatym kwasem octowym do pH 4,5, ogrzewano w łaźni wodnej (80°C , 30 min) i wirowano ($6000\times g$, 15 min). Supernatant stosowano do dalszych oznaczeń.

4.3.7.5. Hydroliza laktozy katalizowana przez Pw β gal

Hydrolizę laktozy prowadzono przy użyciu wolnej Pw β gal, wolnych komórek rekombinowanej *E. coli* i *P. pastoris*. Medium reakcyjne stanowił 3% w/v roztwór laktozy w 50 mM buforze octanowym pH 5,4 (zastosowano substrat o niskim stężeniu, by reakcja hydrolizy była przemianą faworyzowaną). Aktywność β -galaktozydazy w środowisku równa była 1 U/cm^3 , a reakcję prowadzono przez 6 godzin w temperaturze 80 i 90°C . W ustalonych odstępach czasu pobierano próbki hydrolizatów, które oczyszczano i analizowano chromatograficznie.

4.3.7.6. Synteza laktulozy w reaktorze kolumnowym

Szklany reaktor kolumnowy o wysokości 40 cm i średnicy wewnętrznej 1 cm, wyposażony w płaszcz grzejny (Rysunek 4.1.), napełniano granulami biokatalizatora. Szczyt złoża obciążano warstwą szklanych kulek zapobiegającą zmianom ułożenia granul. Złoże zalewano substratem (10% w/v laktozy i 10% w/v fruktozy w 50 mM buforze octanowym pH 5,4; całkowita objętość 100 cm^3),

włączano ogrzewanie reaktora i po osiągnięciu przez czynnik grzewczy (gliceryna) temperatury 60 lub 80°C, uruchamiano cyrkulację substratu przez biokatalizator (1,5 cm³/min; od dołu do góry reaktora). W założonych odstępach czasu pobierano próbkę mieszaniny reakcyjnej, którą następnie oczyszczano i analizowano metodą HPLC. Ubytek mieszaniny uzupełniano taką samą porcją świeżego substratu. Reakcję prowadzono przez 40 godzin.

4.3.7.7. Otrzymywanie laktulozy w reaktorze barbotażowym

W szklanym reaktorze kolumnowym o średnicy wewnętrznej 5,4 cm i wysokości 12,0 cm, wyposażonym w płaszcz grzejny, umieszczano 100 cm³ substratu (10% w/v laktoza i 5% w/v fruktoza w 50 mM buforze octanowym o pH 5,4) oraz tyle preparatu immobilizowanych komórek, aby aktywność β -galaktozydazy w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 0,6 U/cm³. Reaktor zamykano szczelnie u góry gumowym korkiem. Przez jeden z otworów w korku do wnętrza reaktora za pośrednictwem perforowanego wężyka z tworzywa sztucznego doprowadzono powietrze (czynnik mieszający), w drugim zainstalowano chłodnicę zwrotną, przez którą powietrze opuszczało reaktor (Rysunek 4.2.). Zawartość reaktora ogrzewano. Czynnik grzewczy stanowiła gliceryna. Reakcję prowadzono przez 2 - 40 godzin. W określonych odstępach czasu przez otwór w ścianie reaktora, znajdujący się ponad poziomem cieczy i zamykany szklanym korkiem, pobierano próbkę hydrolizatu. Ubytek mieszaniny reakcyjnej uzupełniano świeżą porcją substratu. Zebrane próbki następnie oczyszczano i analizowano metodą HPLC. Warunki syntezy laktulozy w reaktorze barbotażowym optymalizowano uwzględniając:

- aktywność β -galaktozydazy (zawartość złoża) w mieszaninie reakcyjnej (0,1–3 U/cm³; 10% w/v laktoza i 5% w/v fruktoza; pH 5,4; 24 godz; 60°C),
- stężenie substratów w mieszaninie reakcyjnej (**a**) laktoza 5% w/v i fruktoza 5–15% w/v; **b**) laktoza 10% w/v i fruktoza 5-15% w/v; 0,6 U/cm³; pH 5,4; 24 godz; 60°C),
- temperaturę reakcji (60, 70, 80, 90°C; 10% w/v laktoza i 5% w/v fruktoza; 0,6 U/cm³ komórek; pH 5,4; 40 godz).

Produktywność procesu, w przypadku syntez prowadzonych zarówno w reaktorze kolumnowym lub barbotażowym, jak i w mniejszej skali w kolbie stożkowej, obliczano dzieląc stężenie produktu w medium poreakcyjnym przez czas reakcji.

4.3.8. Analiza jakościowa i ilościowa produktów reakcji enzymatycznych

Produkty biotransformacji, prowadzonych z zastosowaniem wolnego/unieruchomionego enzymu lub komórek, analizowano jakościowo i ilościowo metodą HPLC.

4.3.8.1. Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej

Próbki wirowano (10000×g, 1 min), rozcieńczano odpowiednio wodą dejonizowaną lub, w przypadku hydrolizatów uzyskanych przy użyciu biokatalizatorów immobilizowanych, 1 mM wodnym roztworem kwasu cytrynowego i poddawano ultrafiltracji (30 kDa MWCO, Amicon Ultra, Millipore, USA) pod wpływem siły odśrodkowej (3000×g, 15 min, 10°C) w celu usunięcia białek, a następnie sączono przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,2 μm (Whatman, USA). W analogiczny sposób przygotowywano wodne roztwory wzorców (fruktozy, galaktozy, glukozy, laktulozy, laktozy). Oczyszczone próbki przechowywano do czasu analizy w temperaturze -30°C.

4.3.8.2. Analiza produktów reakcji metodą HPLC

Produkty prowadzonych reakcji rozdzielano na kolumnie z jonami Pb^{2+} Transgenomic CHO-682 300×7,8 mm 7 μm (Transgenomic Inc., USA). 0,02 cm³ próbki nastrzykiwano przy użyciu autosamplera na kolumnę i eluowano wodą dejonizowaną (18,2 Ω×cm, Milli-Q Advantage A10, Millipore, USA) w temperaturze 80°C przy natężeniu przepływu równym 0,35 cm³/min. Składniki próbki identyfikowano przez porównanie czasów retencji nieznanej substancji i wzorca. Zawartość poszczególnych składników obliczano na podstawie powierzchni odpowiadających im pików. Powierzchnie pików przeliczano na stężenie za pomocą równań krzywych wzorcowych.

Innym stosowanym w analizie jakościowej układem chromatograficznymi była kolumna aminowa Hypersil APS-2 250×4,6 mm 5μm (Thermo Scientific) eluowana mieszaniną acetonitrylu i wody dejonizowanej (75:25 v/v; 1,0 cm³/min; 25°C).

4.3.8.3. Analiza produktów reakcji metodą TLC

W analizie produktów biotransformacji sacharydów metodą TLC zastosowano układ rozwijający opracowany przez Mayer i wsp. [2004]. Około 0,004 cm³ próbki/wzorca наносono na płytkę do TLC pokrytą żelą krzemionkowym 60 (Merck) za pomocą mikrostrzykawki. Chromatogram rozwijano jednokierunkowo, po czym suszono płytkę na powietrzu. Faza ruchoma zawierała 2-propanol, lodowaty kwas octowy i 0,5% (w/v) kwasu borowego w proporcji 60:3:10 (v/v/v). Chromatogram wizualizowano przez spryskanie płytki odczynnikami wywołującym (10 cm³ 4% (w/v) roztworu chlorowodoru aniliny w etanolu, 10 cm³ 4% (w/v) roztworu difenylaminy w etanolu oraz 3 cm³ 65% (v/v) wodnego roztworu kwasu ortofosforowego) i ogrzewanie w temperaturze 105°C przez 10 min.

4.3.9. Obliczanie zawartości tGOS i pozostałości laktozy w mieszaninach po reakcji

Zawartość tGOS (C_{tGOS}) w mieszaninach po reakcji obliczano w następujący sposób:

a) $C_{\text{tGOS}} = C_{\text{Glc}} - C_{\text{Gal}}$ [mol/dm³], w przypadku syntezy *trans*-galaktooligosacharydów,

b) $C_{\text{tGOS}} = C_{\text{Glc}} - C_{\text{Gal}} - C_{\text{Lu}}$ [mol/dm³], w przypadku syntezy laktulozy,

gdzie C_{Glc} , C_{Gal} , C_{Lu} oznaczają stężenie molowe odpowiednio glukozy, galaktozy i laktulozy wyznaczone na podstawie powierzchni ich pików chromatograficznych.

Pozostałość laktozy (C_{Lac}) oszacowywano na podstawie przeliczenia:

$$C_{\text{Lac}} = C_{\text{Lac0}} - C_{\text{Glc}} \text{ [mol/dm}^3\text{]},$$

gdzie C_{Lac0} oznacza początkowe stężenie molowe laktozy w mieszaninie reakcyjnej.

Oszacowanie to jest nieco zaniżone w stosunku do rzeczywistego, ponieważ nie uwzględnia ilości laktozy, która podczas procesu została wykorzystana jako akceptor reszty galaktozylovej.

5. Rezultaty

5.1. Oczyszczanie termofilnej Pw β gal

Preparat termofilnej rekombinantowej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* izolowano z komórek *E. coli* i podczyszczano według procedury opisanej w podrozdziale 4.3.1. Czystość preparatu sprawdzano techniką SDS-PAGE, przy czym elektroforegram wywoływano za pomocą Coomassie Brilliant Blue. W wyniku zastosowanej procedury uzyskiwano prawie homogeniczny preparat o masie cząsteczkowej około 60 kDa (Rysunek 5.1.), co jest zgodne z masą cząsteczkową 61,7 kDa wyznaczoną dla tego enzymu przez Maciuńska i Synowieckiego [2002] metodą chromatografii żelowej, i aktywności 4000 ± 200 U/g względem oNP β Gal w pH 5,4 i temperaturze 70°C.

5.2. Zastosowanie Pw β gal do katalizowania reakcji odwrotnej hydrolizy i transglikozylacji. Wybór odpowiedniego akceptora reszty glikozyłowej

Preparat Pw β gal zbadano pod kątem możliwości zastosowania go do katalizowania reakcji odwrotnej hydrolizy i/lub transglikozylacji. W tym celu przeprowadzono dwie odrębne reakcje (80°C, 8 godz), w których jedynym substratem była 10% w/v galaktoza (odwrotna hydroliza) lub 15% w/v laktoza (transglikozylacja). Jediną substancją wykrytą w mieszaninie poreakcyjnej zawierającej galaktozę był sam substrat (Rysunek 5.2.). Niewykluczone, że wydłużenie inkubacji substratu z enzymem (nawet do kilku dni) przyniosłoby lepsze rezultaty, jednak taka procedura byłoby bardzo nieefektywna. Mieszanina poreakcyjna otrzymana w wyniku działania Pw β gal na laktozę zawierała zarówno produkty hydrolizy cukru mlecznego, jak i znaczne ilości trans-galaktooligosacharydów (Rysunek 5.2.).

Następnie przeanalizowano możliwość wykorzystania innych akceptorów reszty galaktozyłowej, w tym różnorodnych mono- oraz disacharydów, a także alkoholi (Rysunki 5.3.- 5.7.). W mieszaninach po reakcji przeprowadzonej przy udziale laktozy (donor reszty galaktozy) i tych substancji zaobserwowano występowanie dodatkowego/ych produktu/ów, w porównaniu z produktami reakcji otrzymanymi dla czystej laktozy. Obecność testowanych akceptorów powodowała zmniejszenie efektywności syntezy tGOS. W warunkach eksperymentu glukoza całkowicie hamowała aktywność Pw β gal i w jej obecności nie zachodziła ani synteza tGOS, ani hydroliza laktozy (Rysunek 5.4.). Potencjalnie przydatnymi akceptorami okazały się natomiast ksyloza, ryboza (Rysunek 5.3.), fruktoza, galaktoza, mannoza, sorboza (Rysunek 5.4.), wszystkie użyte alkohole (Rysunek 5.5.) oraz maltoza, sacharoza i celobioza (Rysunek 5.6.). W przypadku transferu galaktozy na maltozę i sacharozę w mieszaninach poreakcyjnych dominował pojedynczy produkt transglikozylacji. Z kolei w przypadku celobiozy uzyskano mieszaninę oligosacharydów o różnym stopniu polimeryzacji, przy czym znaczna część celobiozy ulegała rozkładowi do glukozy. Pw β gal wykazała również zdolność do syntezy trans-

oligosacharydów z laktulozy jako jedynego substratu, pomimo że laktuloza okazała się nienajlepszym akceptorem reszty glikozylowej (Rysunek 5.7.).

Szczególną uwagę zwrócono jednak na produkt uzyskany z laktozy i fruktozy (Rysunek 5.4.). W zastosowanym układzie analitycznym (kolumna Pb^{2+} /woda) pik chromatograficzny odpowiadający temu produktowi posiadał identyczny czas retencji (22,97 min), co wzorzec laktulozy (Rysunek 5.8.A.). By zweryfikować przypuszczenie, że $Pw\beta gal$ może produkować laktulozę na drodze transglikozylacji, uzyskaną mieszaninę poreakcyjną rozdzielono na frakcje na kolumnie Pb^{2+} , a frakcję zawierającą badaną substancję poddano analizie jakościowej w układzie kolumna NH_2 /acetonitryl:woda. Rozdział mieszaniny poreakcyjnej na frakcje był konieczny, ponieważ zawarte w niej anality nie ulegały separacji na kolumnie NH_2 pomimo zmian składu i prędkości przepływu fazy ruchomej. Wyizolowana substancja również w drugim układzie analitycznym posiadała taki sam czas retencji (9,42 min), co wzorcowa laktuloza (Rysunek 5.8.B.). Obecność laktulozy w mieszaninie poreakcyjnej, nierozdzielonej na frakcje, potwierdzono ponadto techniką TLC w układzie zaproponowanym przez Mayer i wsp. [2004] (Rysunek 5.9.). Syntezę laktulozy, ze względu na łatwość analizy tego disacharydu metodą HPLC oraz możliwość stosowania go w leczeniu lub produkcji żywności funkcjonalnej, wybrano jako model do badania aktywności transglikozylacyjnej rekombinantowej β -galaktozydazy z *P. woesei*. O tym wyborze zdecydowała również niewielka liczba doniesień literaturowych (zaledwie 5) dotyczących enzymatycznej produkcji laktulozy. Inny znakomity model do badania potencjału transglikozylacyjnego $Pw\beta gal$ mogłaby stanowić synteza tGOS. Niestety, w układach analitycznych, którymi dysponowano, laktoza oraz powstające w trakcie transglikozylacji disacharydy nie ulegały separacji (Rysunek 5.10.). Oznaczenie w próbkach po reakcji pozostałości laktozy było zatem praktycznie niewykonalne, co z kolei nie pozwalało na obliczenie uzysku tGOS na podstawie bilansu masy reakcji. Wartość tą można było jedynie oszacować w oparciu o różnicę stężeń glukozy i galaktozy w próbkach po reakcji. O trudnościach związanych z analizą chromatograficzną laktozy i tGOS donoszą także inni autorzy, proponując jednocześnie oznaczenie tych analitów techniką wysokosprawnej chromatografii anionowymiennej z detekcją amperometryczną (HPAEC-PAD). Wspomnianym układem Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej jednak nie dysponuje.

5.3. Immobilizacja rekombinantowej β -galaktozydazy z *P. woesei*

5.3.1. Wprowadzenie

Jak wykazano wcześniej, rekombinantowa β -galaktozydaza z *Pyrococcus woesei* wytwarza na drodze transglikozylacji laktulozę z laktozy i fruktozy. Podczyszczona $Pw\beta gal$, ze względu na nieskomplikowaną procedurę przygotowania, jest preparatem stosunkowo niedrogim, co pozwala na stosowanie świeżej porcji enzymu w każdym cyklu produkcyjnym. Jednak w dużej skali, gdy zużycie

oraz nakłady na biokatalizator są znacznie większe, korzystniejsze jest prowadzenie procesów z użyciem enzymów immobilizowanych. Pwβgal była wcześniej przez innych autorów unieruchamiana na chitynie za pośrednictwem aldehydu glutarowego [Dąbrowski i wsp., 2000], w żelu chitozanowym [Wanarska, 2005] oraz na powierzchni żelu krzemionkowego modyfikowanego 3-aminopropylotrietoksyilanem za pośrednictwem aldehydu glutarowego lub transglutaminazy [Wołosowska, 2006]. Wiązanie enzym-nośnik uzyskane w pierwszym przypadku było zbyt słabe i preparat szybko tracił aktywność. Z kolei żel chitozanowy w warunkach optymalnych dla enzymu (lekkie kwaśne pH, temperatura > 70°C) jest niestabilny. Najciekawsze rezultaty dało trzecie rozwiązanie, jednak wysoki koszt nośnika czynił stosowanie takiego preparatu w skali przemysłowej mało opłacalnym. W niniejszej pracy skupiono się na jak największym obniżeniu kosztów przygotowania immobilizowanej Pwβgal, by była ona atrakcyjna z punktu widzenia przemysłowej syntezy oligosacharydów lub hydrolizy laktozy.

Rezygnując z izolacji i oczyszczania Pwβgal i stosując całe komórki rekombinowanej *E. coli* można osiągnąć dwie korzyści: jednocześnie uzyskać enzym immobilizowany w mikrokapsułkach, których rolę w warunkach reakcji spełniają niewykazujące aktywności życiowej komórki bakteryjne, oraz zmniejszyć koszt wytworzenia biokatalizatora. Środowisko wewnątrzkomórkowe stabilizuje β-galaktozydazę, która w takiej formie może zostać łatwo oddzielona od medium po reakcji (na przykład przez sedimentację lub wirowanie) i wykorzystana w kolejnym cyklu produkcyjnym. Podejście to nie umożliwia jednak prowadzenia procesu w sposób ciągły w reaktorze kolumnowym, który wymusza dodatkowe unieruchomienie komórek lub enzymu na nierozpuszczalnym nośniku.

Na tym etapie badań sprawdzono możliwość zwiększenia aktywności katalitycznej komórek *E. coli* poprzez zastosowanie procedury permeabilizacji, wybrano nośnik stabilny w warunkach reakcji i dogodny do immobilizacji Pwβgal oraz komórek *E. coli*, zoptymalizowano procedurę unieruchamiania, jak również porównano podstawowe właściwości otrzymanych form biokatalizatora.

5.3.2. Permeabilizacja komórek rekombinowanej *E. coli*

Stosowanie całych komórek jako katalizatorów reakcji enzymatycznych posiada wadę, którą jest ograniczenie dostępności substratu spowodowane obecnością błony cytoplazmatycznej, ściany komórkowej, a w przypadku bakterii gramujemnych także błony zewnętrznej. Integralność tych struktur można częściowo zaburzyć stosując odpowiednie metody permeabilizacji [Felix, 1982]. Sprawdzone zatem, jak permeabilizacja błony zewnętrznej za pomocą glicyny, kwasu cytrynowego lub kwasu mlekowego, oraz permeabilizacja błony zewnętrznej i cytoplazmatycznej przy użyciu etanolu lub izopropanolu, wpłynie na następujące właściwości komórek:

- aktywność β-galaktozydazy wykazywaną przez zawiesinę komórek

- uwalnianie białka z komórek do środowiska reakcji
- integralność błony zewnętrznej mierzona intensywnością fluorescencji 1-N-fenylonaftyloaminy (parametr $F_{NPN(n)}/F_{NPN(k)}$)
- integralność błony cytoplazmatycznej mierzona intensywnością fluorescencji jodku propidyny (parametr $F_{PI(n)}/F_{PI(k)}$)

Wpływ substancji permeabilizujących na błony komórkowe *E. coli* porównano z efektem, jaki wywiera na nie podwyższona temperatura reakcji, w której Pw β gal wykazuje wysoką aktywność katalityczną. Wyniki eksperymentów zebrano w tabeli 5.1.

Nie stwierdzono zwiększenia aktywności hydrolitycznej względem oNP β Gal w zawiesinie komórek poddanej działaniu glicyny, kwas cytrynowego oraz mlekowego. Substancje te nie powodowały też zwiększonego wyciekania białka z komórek. 2 - 2,5-krotnie intensywniejsza fluorescencja NPN, w porównaniu z komórkami niepermeabilizowanymi, świadczyła jednak o rozluźnieniu struktury błony zewnętrznej komórek za sprawą kwasu cytrynowego i mlekowego w stężeniach odpowiednio 5-20 mM. Glicyna, w warunkach eksperymentu, nie wywoływała zmian intensywności fluorescencji NPN. Permeabilizacja komórek 50% etanolem lub 50% izopropanolem dawała około dwukrotny wzrost aktywności β -galaktozydazy w zawiesinie komórek. Zestawienie tych wartości z ilością białka wyciekającego z komórek (odpowiednio około 42 i 45 razy więcej, niż w próbce kontrolnej) ujawniło, że wzrost aktywności był wynikiem częściowej lizy komórek i uwolnienia β -galaktozydazy do środowiska. Odczynniki te ponad 3-krotnie zwiększały intensywność fluorescencji NPN w zawiesinie komórek oraz 1,5-krotnie intensywność fluorescencji PI, co świadczyło o destabilizacji obu błon komórkowych. 5-25% etanol i 5-10% izopropanol nie wpływał znacząco na żaden z badanych parametrów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najodpowiedniejszym sposobem chemicznej permeabilizacji komórek *E. coli* było traktowanie ich 25% izopropanolem. Odczynnik ten zwiększał aktywność Pw β gal o około 30%, nie powodując przy tym nadmiernego uwalniania białka do środowiska. Pod jego wpływem rozluźnieniu ulegała błona zewnętrzna komórek, a cytoplazmatyczna pozostawała praktycznie nienaruszona. Spostrzeżenie to odbiegało od wyników uzyskanych przez Cánovas i wsp. [2005], którzy uznali, że traktowanie komórek *E. coli* 20% etanolem lub izopropanolem jest tak samo skuteczne i poprawia wydajność badanej przez nich biotransformacji.

Inkubacja komórek w coraz wyższych temperaturach powodowała stopniowy wzrost aktywności β -galaktozydazy w zawiesinie, maksymalnie o 45% w 100°C. Równolegle zwiększała się ilość białka uwalnianego przez komórki. Z próbki po inkubacji w 100°C wyekstrahowano aż 13 razy więcej białka, niż z próbki kontrolnej. Ilość ta była jednak znacznie mniejsza w porównaniu z ilością białka uwalnianą przez komórki traktowane 50% etanolem lub izopropanolem, na co mogła mieć wpływ termiczna denaturacja białek *E. coli*. TemperatURY 70-100°C równie silnie, co 50% etanol i 2-propanol,

destabilizowały błonę zewnętrzną komórek, natomiast błonę cytoplazmatyczną dopiero temperatury 80-100°C.

Uzyskane rezultaty wskazują, że w podwyższonej temperaturze cieplne naruszenie integralności błony cytoplazmatycznej i zewnętrznej jest na tyle wyraźne, że dodatkowa chemiczna permeabilizacja komórek nie jest potrzebna. Wniosek ten potwierdzają wyniki Kamrat'a i Nidetzky'ego [2007], którzy odnotowali jednakową aktywność wewnątrzkomórkowej rekombinantowej β -glikozydazy z *Pyrococcus furiosus* w zawiesinie komórek *E. coli* oraz ekstrakcie bezkomórkowym przygotowanym z takiej samej ilości biomasy. Badacze ci zaobserwowali również zwiększone uwalnianie enzymu do środowiska reakcji pod wpływem podwyższonej temperatury.

5.3.3. Wybór nośnika i optymalizacja warunków unieruchamiania Pw β gal i komórek *E. coli*

Efektywna immobilizacja termofilnych enzymów stanowi spore wyzwanie. W warunkach podwyższonej temperatury wiele nośników częściowo lub całkowicie traci stabilność mechaniczną, osłabieniu ulegają oddziaływania adsorpcyjne oraz wiązania kowalencyjne pomiędzy enzymem a złożem. W przypadku Pw β gal, poszukiwano nośnika, który umożliwiłby trwałe unieruchomienie zarówno podczyszczonego enzymu, jak i wytwarzających go rekombinowanych komórek *E. coli*. Ponieważ wiązanie na powierzchni nośnika jest mało skuteczne w odniesieniu do immobilizacji komórek, wybrano metodę pułapkowania w alginianie wapnia. Żel ten jest niedrogi, nietoksyczny, łatwy do formowania i dozwolony do stosowania w żywności, ale przede wszystkim zachowuje stabilność w temperaturze do 85°C [Orive i wsp., 2006].

Warunki unieruchamiania optymalizowano równolegle dla komórek *E. coli* oraz podczyszczonego enzymu, co miało na celu znalezienie parametrów dogodnych dla immobilizacji obu form biokatalizatora. Uzyskiwane złoża, dzięki wkraplaniu mieszaniny alginianu sodu i enzymu/bakterii do roztworu CaCl₂, miały kształt kulistych granul.

W pierwszej kolejności zbadano wpływ rosnącego stężenia żelu alginianu wapnia, stężenia roztworu chlorku wapnia oraz czasu immobilizacji na wykazywaną przez preparaty aktywność β -galaktozydazy. Aktywność granul wytworzonych z 1% żelu była znacznie wyższa, niż w pozostałych przypadkach, ponieważ posiadały one bardzo nieregularne kształty, przez co ich powierzchnia była silniej rozwinięta. Niestety granule te były jednocześnie bardzo kruche. Wzrost zawartości alginianu w złożu nie powodował spadku aktywności preparatów unieruchomionych komórek lub enzymu (Rysunek 5.11.A). Prawdopodobnie żele o badanych stężeniach nie stanowiły w warunkach reakcji znaczącej bariery dyfuzyjnej dla substratu. Granule obu biokatalizatorów utwardzane w 0,5% w/v CaCl₂ charakteryzowały się nieregularnymi kształtami. Podwyższanie stężenia chlorku wapnia w roztworze utwardzającym żel nie wywoływało zasadniczych zmian aktywności złoża z unieruchomionymi

komórkami *E. coli*, natomiast wyraźnie obniżało aktywność preparatu zawierającego enzym (Rysunek 5.11.B). 2% CaCl_2 powodował 21% utratę aktywności unieruchomionego enzymu, ale w tym roztworze żelowanie alginianu zachodziło szybciej, przez co granule uzyskiwały regularniejszy kształt. Spadek aktywności immobilizowanej $\text{Pw}\beta\text{gal}$ był prawdopodobnie skutkiem działania stężonych roztworów CaCl_2 . Pod wpływem chlorku wapnia aktywność traciły również pułapkowane w alginianie wapnia β -galaktozydaza wyizolowana z drożdży *Kluyveromyces lactis* [Becerra i wsp., 2001] oraz usieciowana z konkanawaliną A β -galaktozydaza z *Aspergillus oryzae* [Haider i Husain, 2007]. Aktywność badanych preparatów nie ulegała natomiast zmianom w trakcie wydłużanego (2-12 godzin) zestalania żelu w 2% CaCl_2 (Rysunek 5.11.C). Na podstawie zebranych danych oraz obserwacji postaci granul złoża obydwu preparaty do dalszych badań zdecydowano przygotowywać z 3% alginianu sodu utwardzanego przez 4 godziny w 2% w/v CaCl_2 , co zapewniało formowanie trwałych granul alginianu wapnia o regularnych i powtarzalnych kulistych kształtach.

Następnie zbadano zmiany aktywności złoża towarzyszące wzrostowi średnicy, a tym samym masy granul (Tabela 5.2.). Co ciekawe, pomimo stosowania do formowania obu biokatalizatorów alginianu o identycznym stężeniu i igieł o jednakowej średnicy, granule unieruchomionego enzymu o największych rozmiarach były o 15-20% mniejsze, niż analogiczne granule zawierające bakterie. Przyczyną tego efektu mogła być różnica lepkości obu mieszanin wpływająca na wielkość powstających granul. W przypadku immobilizowanego enzymu spadek aktywności preparatu wynosił około 14% przy zwiększeniu średnicy granul z 2,45 do 4,14 mm. Immobilizowane bakterie traciły aż 32% aktywności gdy średnica rosła od 2,47 do 4,94 mm. Kolejne eksperymenty prowadzono zatem przy użyciu najmniejszych drobin obu preparatów.

Ostatnim rozpatrywanym parametrem determinującym aktywność przygotowywanych preparatów była zawartość enzymu lub bakterii w płynnym alginianie sodu (Tabela 5.3.). Po przekroczeniu stężenia enzymu w mieszaninie równego 4 mg/cm^3 nie obserwowano znaczącego wzrostu aktywności uzyskiwanych biokatalizatorów. Takim granicznym stężeniem w przypadku bakterii było 175 mg/cm^3 . Ze względu na planowane porównanie właściwości obu preparatów, zdecydowano stosować w dalszych badaniach złoża o stężeniu 4 mg/cm^3 enzymu lub 100 mg/cm^3 bakterii. Wykazywały one bowiem bardzo zbliżone aktywności β -galaktozydazy (w przybliżeniu $3,6 \text{ U/g}$ biokatalizatora).

5.3.4. Porównanie aktywności hydrolitycznej wolnych i unieruchomionych biokatalizatorów

Zamknięcie enzymu w mikrokapsułce komórki oraz immobilizacja wyizolowanego enzymu lub komórek z enzymem na nierozpuszczalnym nośniku może spowodować zmianę ich właściwości katalitycznych, dlatego też zbadano, jak unieruchomienie termostabilnej β -galaktozydazy z *P. woesei*

w postaci podczyszczonego preparatu i komórek z enzymem, wpłynęło na jej aktywność hydrolityczną względem oNPβGal. Uwzględniono przy tym zależność aktywności preparatów od temperatury i pH środowiska reakcji. Nie oznaczono termo- i pH-stabilności porównywanych form termofilnej β-galaktozydazy, ponieważ wielkości te dla podczyszczonej Pwβgal zostały uprzednio scharakteryzowane przez Maciuńską [1999], natomiast dla preparatów immobilizowanych za istotniejszą uznano ich stabilność podczas wielokrotnego wykorzystania porcji biokatalizatora w kolejnych cyklach produkcyjnych.

Wolna Pwβgal wykazywała najwyższą aktywność hydrolityczną w temperaturze 93°C (Rysunek 5.12.). W temperaturach wyższych jej aktywność gwałtownie malała. Po unieruchomieniu w alginianie wapnia optimum temperaturowe β-galaktozydazy wzrosło do 98°C, ale spadła aktywność preparatu w niższych temperaturach, przykładowo w 80°C immobilizowana Pwβgal wykazywała 60% aktywności maksymalnej, podczas gdy wolny enzym 70%. Niewielki wzrost aktywności w wyższych temperaturach enzymu immobilizowanego w stosunku do wolnego obserwowano również w przypadku unieruchomionej w κ-karagenianie α-galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* [Girigowda i Mulimani, 2006] oraz immobilizowanej na Eupergicie C β-galaktozydazy z termofilnego grzyba *Talaromyces thermophilus* [Nakkhart i Haltrich, 2006], z drugiej strony α-galaktozydaza z *Penicillium griseoroseum* związana za pomocą aldehydu glutarowego z powierzchnią modyfikowanego żelu krzemionkowego [Falkoski i wsp., 2009], α-galaktozydaza z *Gibberella fujikuroi* unieruchomiona w żelu poliakrylamidowym [Thippeswamy i Mulimani, 2002] oraz β-galaktozydaza z *Aspergillus oryzae* usieciowana z konkanawaliną A i immobilizowana w alginianie wapnia [Haider i Husain, 2007] wykazywały najwyższe aktywności w tych samych temperaturach, co wolne enzymy.

Zarówno Pwβgal mikrokapsułkowana w komórkach *E. coli*, jak i komórki pułapkowane w alginianie, były najaktywniejsze w temperaturach 95-98°C (Rysunek 5.12.), a zatem wyższych niż wolny enzym. Komórki z enzymem, w porównaniu z wolną Pwβgal, przejawiały też mniejszy spadek aktywności w temperaturach powyżej optimum. W temperaturze 105°C mikrokapsułkowana β-galaktozydaza wykazywała 80% aktywności maksymalnej, wolny enzym zaledwie 34%. Powyższe rezultaty są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Hipertermofilna β-glikozydaza z *Pyrococcus furiosus* mikrokapsułkowana w komórkach *E. coli* najbardziej aktywna była w temperaturze o około 10°C wyższej, niż wolny enzym (odpowiednio 100 i 90°C) [Kamrat i Nidetzky, 2007], natomiast immobilizowane w alginianie wapnia komórki *E. coli* wytwarzające rekombinantową izomerazę arabinozową z *Thermotoga neapolitana* najwyższą aktywność wykazywały w 90°C, a wolna izomeraza w 85°C [Hong i wsp., 2007].

W pH równym 5,4 obserwowano najwyższą aktywność hydrolityczną wolnej i immobilizowanej Pwβgal oraz immobilizowanych komórek *E. coli* (Rysunek 5.13.). Zależność aktywności od pH kształtowała się podobnie w przypadku wolnego i unieruchomionego enzymu, natomiast unieruchomione komórki wykazywały wysoką aktywność w szerszym zakresie pH (powyżej 87% aktywności maksymalnej w pH 4,0-6,0). W takim samym pH najwyższą aktywność wykazywały także wolna izomeraza arabinozowa z *Thermotoga neapolitana* oraz immobilizowane rekombinowane komórki *E. coli* z tym enzymem [Hong i wsp., 2007], wolna i immobilizowana w κ-karagenianie α-galaktozydaza z *Aspergillus oryzae* [Girigowda i Mulimani, 2006], jak również wolna oraz usieciowana z konkanawaliną A i immobilizowana w alginianie wapnia β-galaktozydaza z *Aspergillus oryzae* [Haider i Husain, 2007]. Odmienne zachowanie zaobserwowano natomiast w przypadku wolnych komórek *E. coli* z Pwβgal, dla których najodpowiedniejszym pH okazało się pH 4,0. Komórki *E. coli* produkujące rekombinantową D-hydantoinazę z *Agrobacterium radiobacter* także wykazywały najwyższą aktywność w pH nieco niższym, niż komórki immobilizowane w κ-karagenianie (odpowiednio 7,0 i 7,5) [Chao i wsp., 1999], z drugiej strony wolne komórki *E. coli* produkujące rekombinantową izomerazę arabinozową z *Geobacillus stearothermophilus* były bardziej aktywne w pH 7,5, podczas gdy te same komórki unieruchomione w alginianie wapnia w pH 7,0 [Jung i wsp., 2005].

Uzyskane rezultaty wskazują, że immobilizacja stabilizuje Pwβgal w temperaturach wyższych niż optymalna dla wolnego enzymu. Trudno jest natomiast sformułować ogólny wniosek na temat wpływu pH na otrzymane biokatalizatory. Działanie pH medium reakcyjnego na Pwβgal zamkniętą w komórce *E. coli* jest prawdopodobnie w dużym stopniu niwelowane przez wewnątrzkomórkowe białka bakteryjne, które działają buforująco. Ponadto pH może zmieniać wypadkowy ujemny ładunek elektryczny na powierzchni komórki, modyfikując tym samym jej przepuszczalność. W końcu pH wpływa na wypadkowy ładunek elektryczny alginianu wapnia (ujemny w pH obojętnym i zasadowym, obojętny w pH kwaśnym) i zmienia charakter oddziaływań pomiędzy polisacharydem a enzymem/komórką.

5.4. Synteza laktulozy katalizowana przez wolną i unieruchomioną Pwβgal

5.4.1. Optymalizacja warunków syntezy laktulozy

Preparaty wolnej podczyszczonej β-galaktozydazy z *P. woesei*, Pwβgal mikrokapsułkowej w komórkach *E. coli* oraz enzymu lub komórek immobilizowanych w alginianie wapnia zastosowano jako katalizatory w syntezie laktulozy z laktozy i fruktozy na drodze transglikozylacji. Biokatalizatory te wykazywały względem oNPβgal aktywność β-galaktozydazy równą 4000±200 U/g enzymu, 100±20 U/g wilgotnych komórek, 3,6±0,19 U/g unieruchomionego enzymu oraz 3,7±0,4 U/g unieruchomionych komórek (70°C; 50 mM bufor octanowy pH 5,4; 3 min). Pułapkowanie enzymu lub

komórek w nierozpuszczalnym nośniku spowodowała bardzo wyraźne „rozcieńczenie” ich aktywności. Należy jednak wziąć pod uwagę, że reakcja z oNP β gal trwa bardzo krótko, zaledwie 3 min, a zatem uczestniczą w niej tylko cząsteczki enzymu lub komórki unieruchomione blisko powierzchni granuli alginianu wapnia. Podczas znacznie dłuższej reakcji transglikozytacji w katalizę zaangażowane są także enzym/komórki pułapkowane w głębszych warstwach żelu. Co więcej, jak wykazano wcześniej, immobilizacja stabilizuje szczególnie podczyszczoną Pw β gal w wyższych temperaturach. Pozwala to przypuszczać, że biokatalizatory immobilizowane będą bardziej efektywne, niż wolne.

Na tym etapie badań zbadano wpływ stężenia substratów (laktozy i fruktozy), aktywności biokatalizatora w medium reakcyjnym oraz temperatury i pH środowiska na uzysk laktulozy w reakcjach katalizowanych przez każdą z form β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei*. Sprawdzono także stabilność immobilizowanych preparatów podczas wielokrotnego wykorzystania porcji biokatalizatora w oddzielnych cyklach syntezy laktulozy.

Syntezie laktulozy katalizowanej przez Pw β gal sprzyjało podwyższanie stężeń obu substratów w medium reakcyjnym (Rysunek 5.14.). W przypadku wszystkich badanych preparatów wyraźny wzrost ilości produkowanej laktulozy dawało zwiększanie początkowego stężenia laktozy w medium reakcyjnym do 10% w/v (Rysunek 5.14.A.). Przy wyższych stężeniach przyrost laktulozy wynosił zaledwie 2-2,5 g na każde dodatkowe 50 g substratu w medium reakcyjnym. Ograniczenie przyrostu, a nawet spadek wydajności syntezy był prawdopodobnie konsekwencją transferu reszt galaktozylowych na cząsteczki laktozy i tworzenia galaktooligosacharydów.

W większym stopniu, niż stężenie laktozy, na ilościową produkcję laktulozy wpływało stężenie akceptora reszty galaktozylowej- fruktozy (Rysunek 5.14.B.). Wolny i immobilizowany enzym najefektywniej produkowały laktulozę, gdy zawartość fruktozy w mieszaninie reakcyjnej była równa 10% w/v. Wyższe stężenia fruktozy nie wywierały wpływu na wydajność syntezy prowadzonej przez te biokatalizatory. Wolne i immobilizowane komórki syntetyzowały tym więcej laktulozy, im wyższe było stężenie fruktozy w środowisku reakcji. Podobnie jednak, jak w przypadku laktozy, stężenia fruktozy wyższe niż 10% w/v nieznacznie poprawiały wydajność syntezy. W obecności 20% w/v fruktozy obydwa biokatalizatory produkowały tylko o około 5 g/dm³ laktulozy więcej, niż gdy stężenie tego substratu było dwukrotnie niższe. Obniżenie wydajności procesu obserwowane przy wyższych stężeniach fruktozy było przypuszczalnie rezultatem utrudnionego wiązania laktozy przez enzym w tych warunkach [Mayer i wsp., 2004]. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że niezależnie od formy biokatalizatora podczas syntezy laktulozy katalizowanej przez Pw β gal najrozsądniej jest stosować stężenie każdego z substratów równe 10% w/v, co w przybliżeniu odpowiada stosunkowi molowemu laktozy do fruktozy 1:2. Dla β -galaktozydazy z *Sulfolobus solfataricus* [Kim i wsp., 2006] oraz permeabilizowanych komórek *Kluyveromyces lactis* [Lee i wsp., 2004] syntetyzujących laktulozę

najlepsze wyniki osiągnęto, gdy stosunek masy laktozy do fruktozy wynosił blisko 1:1 (40% w/v laktozy i 20% w/v fruktozy), a w przypadku β -glikozydazy z *Pyrococcus furiosus* aż 1:15 (3,4% w/v laktozy i 27% w/v fruktozy) [Mayer i wsp., 2004].

W następnej kolejności sprawdzono wpływ aktywności β -galaktozydazy w mieszaninie reakcyjnej na ilość powstającej laktulozy (Rysunek 5.15.). Zwiększanie aktywności β -galaktozydazy w środowisku reakcji w całym badanym zakresie skutkowało wzrostem stężenia laktulozy produkowanej przez wolną Pw β gal i wolne komórki *E. coli*. Powyżej odpowiednio 4,4 i 2,75 U/cm³ przyrost ilości laktulozy był coraz mniejszy, prawdopodobnie dlatego, że przy tak wysokiej zawartości biokatalizatora dominowała reakcja hydrolizy laktozy. W przypadku obu immobilizowanych preparatów synteza laktulozy przebiegała najefektywniej, gdy aktywność β -galaktozydazy w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 0,5-1,5 U/cm³. Przyczyną spadku ilości syntetyzowanej laktulozy prawdopodobnie nie była reakcja hydrolizy, ale pogorszona wymiana masy pomiędzy złożem a medium reakcyjnym lub rozcieńczenie medium reakcyjnego wodą zamkniętą w porach żelu (immobilizowane biokatalizatory nie były bowiem płukane roztworem substratu przed reakcją). Oznaczenie techniką HPLC stężeń laktozy i fruktozy w roztworze substratu niezawierającym i zawierającym immobilizowany preparat potwierdziło drugie przypuszczenie. Rozcieńczanie mogło faworyzować hydrolizę, a tym samym obniżać wydajność transglikozylacji i zmniejszać uzysk laktulozy (im niższe stężenie substratów i większy udział wody w roztworze substratu, tym większa aktywność hydrolityczna), szczególnie przy wysokiej zawartości biokatalizatora w medium reakcyjnym. Przemawia za tym także wzrost w mieszaninie reakcyjnej stężenia glukozy i galaktozy (pomimo rozcieńczania), towarzyszący podnoszeniu zawartości biokatalizatora w medium reakcyjnym (na przykładzie immobilizowanych komórek; Rysunek 5.16.). Efekt rozcieńczenia można by kompensować stosując substrat o odpowiednio wyższym stężeniu lub płucząc biokatalizator przed reakcją dodatkową porcją substratu. Obie metody powodowałyby jednak zwiększenie zużycia substratu, a tym samym podnosiły koszt procesu, dlatego w niniejszej pracy zrezygnowano z ich stosowania uznając, że rozcieńczanie substratu jest inherentną wadą biokatalizatorów pułapkowanych w hydrożelach.

Pomimo efektu rozcieńczenia, przy aktywnościach β -galaktozydazy z przedziału 0,1-1,0 U/cm³ immobilizowane biokatalizatory wykazywały większą efektywność, niż ich wolne formy. Dopiero przy wyższych aktywnościach biokatalizatory wolne zaczęły ujawniać swą przewagę nad immobilizowanymi. Eksperyment ten wykazał również, że wolne i unieruchomione rekombinowane komórki syntetyzowały laktulozę wydajniej, niż wyizolowany lub unieruchomiony enzym. W ilości 1 U/cm³ wolne/unieruchomione komórki wytwarzały około 11 mg/cm³ disacharydu, podczas gdy wolny/unieruchomiony enzym w identycznych warunkach produkował o 35% mniej laktulozy, co mogło wynikać z większej podatności wyizolowanego enzymu na inhibicję pod wpływem glukozy i fruktozy.

Zbliżonych obserwacji dokonano w przypadku izomerazy arabinozowej z *Geobacillus stearothermophilus*. Najbardziej skutecznie galaktozę w tagatozę przekształcały immobilizowane w alginianie wapnia komórki *E. coli* z tym enzymem, nieco gorzej wolne komórki, a w dalszej kolejności wolny i immobilizowany enzym [Jung i wsp., 2005]. W tej pracy nie odnotowano jednak pogorszenia wydajności procesu za sprawą rozcieńczenia medium reakcyjnego przez wodę zamkniętą w porach immobilizowanych biokatalizatorów.

Interesujące wyniki uzyskano badając wpływ pH środowiska na wydajność syntezy laktulozy katalizowanej przez wolną/unieruchomioną Pw β gal. Wolna Pw β gal w pH 3 ulegała wytrąceniu z roztworu i, podobnie jak w przypadku hydrolizy oNP β Gal (Rysunek 5.13.), nie przejawiała żadnej aktywności katalitycznej (Rysunek 5.17.B.). Najwyższą aktywność transglikozylacyjną wykazywała w pH 5,0-5,4, czyli bardzo zbliżonym do optymalnego pH hydrolizy oNP β Gal. Co ciekawe, w pH 8,0 Pw β gal zachowywała aż 72% maksymalnej aktywności transglikozylacyjnej, a tylko 17% maksymalnej aktywności hydrolitycznej. β -galaktozydaza z *Bifidobacterium lungum* [Hsu i wsp., 2007], β -galaktozydaza z *Thermotoga maritima* [Ji i wsp., 2007] oraz β -galaktozydaza z *Aspergillus aculeatus* [Cardelle-Cobas i wsp., 2008] także wykazywały najwyższą aktywność transglikozylacyjną w pH zbliżonym do optymalnego dla hydrolizy. Optymalnym pH dla syntezy laktulozy katalizowanej przez wolne komórki z Pw β gal było pH 3,0-5,4, zatem pH z szerszego zakresu niż w przypadku wolnego enzymu. W wyższych pH aktywność transglikozylacyjna komórek nieznacznie malała, przy czym w pH 8,0 stanowiła 78% wartości maksymalnej, czyli znacznie więcej niż 38% maksymalnej aktywności hydrolitycznej w tym samym pH. Różnic w optymalnym pH syntezy laktulozy katalizowanej przez wyizolowaną i wewnątrzkomórkową β -galaktozydazę z *Kluyveromyces lactis* nie zaobserwował Lee i wsp. [2004]. Unieruchomienie Pw β gal lub komórek w alginianie wapnia praktycznie uniezależniło wydajność reakcji transglikozylacji od zmian pH. Immobilizowany enzym tylko w obu skrajnych pH syntetyzował nieco mniej laktulozy (72 i 87% maksymalnego uzysku), a przy pozostałych wartościach powyżej 90% maksymalnego uzysku laktulozy. Immobilizowane komórki natomiast w całym badanym zakresie pH produkowały laktulozę ze zbliżoną wydajnością. Wpływu pH na otrzymywanie tGOS nie zaobserwowano także w przypadku β -galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* immobilizowanej na tkaninie bawełnianej [Albayrak i Yang, 2002].

Podczas badania wpływu temperatury na ilość laktulozy uzyskiwanej za pomocą Pw β gal w czterech różnych formach, we wszystkich przypadkach w temperaturze 90°C i wyższej obserwowano intensywne brunatnienie mieszanin reakcyjnych. Było ono następstwem reakcji Maillarda, zachodzących w podwyższonej temperaturze w środowisku bogatym w cukry redukujące i białka [Martins i wsp., 2001]. Szczególnie silnemu brunatnieniu ulegały granule alginianu wapnia z

enzymem/komórkami. Stężenie białka we wnętrzu granul było znacznie wyższe, niż w medium reakcyjnym, co mogło intensyfikować formowanie produktów reakcji Maillarda w ich obrębie.

Wolna β -galaktozydaza z *P. woesei* syntetyzowała laktulozę tym efektywniej, im bardziej podnoszono temperaturę procesu (Rysunek 5.17.A.). W temperaturze wyższej niż 90°C obserwowano jednak niewielki spadek uzysku laktulozy wynikający prawdopodobnie z dezaktywacji enzymu pod wpływem temperatury [Synowiecki i Maciuńska, 2002] oraz powstających w środowisku reakcji produktów reakcji Maillarda [Bruins i wsp., 2003a]. W temperaturach wyższych niż 93°C obserwowano także obniżenie aktywności hydrolitycznej Pw β gal względem oNP β gal (Rysunek 5.12.). W temperaturze 45°C maksymalną aktywność hydrolityczną i transglikozylacyjną wykazywała β -galaktozydaza z *Bifidobacterium longum* [Hsu i wsp., 2007]. W wyższych temperaturach szybko traciła jednak obie aktywności. Nieco inaczej zachowywała się β -galaktozydaza z *Thermotoga maritima*, która najefektywniej katalizowała syntezę tGOS w temperaturze 90°C, a hydrolizę laktozy w temperaturze o 10°C niższej [Ji i wsp., 2007]. W niższej temperaturze była też bardziej stabilna. Podwyższanie temperatury w całym badanym zakresie sprzyjało natomiast aktywności transglikozylacyjnej immobilizowanej Pw β gal, podobnie jak miało to miejsce w odniesieniu do jej aktywności hydrolitycznej. Immobilizacja prawdopodobnie zwiększała termostabilność enzymu, co zostało wcześniej odnotowane przez wielu autorów [na przykład: Aslan i Tanriseven, 2007; Falkoski i wsp., 2009; Haider i Husain, 2007; Jung i wsp., 2005; Nakkhart i Haltrich, 2006; Zhou i wsp., 2010]. W przypadku zależności ilości produkowanej laktulozy od temperatury reakcji dla wolnych oraz immobilizowanych komórek obserwowano wyraźne maksimum syntezy w temperaturze 80°C. W wyższych temperaturach uzysk laktulozy był o kilkanaście procent niższy. Podobny efekt zaobserwowano też dla rekombinantowej izomerazy arabinozowej z *Geobacillus stearothermophilus* [Jung i wsp., 2005]. Ponieważ najwyższą aktywność hydrolityczną oba badane preparaty wykazywały w temperaturze 95-98°C, możliwe że w temperaturach wyższych niż 80°C, preparaty te efektywniej katalizowały hydrolizę, niż transglikozylację. Innym brany pod uwagę wyjaśnieniem tej tendencji była wzmożona dezaktywacja Pw β gal pod wpływem intensywnego tworzenia produktów reakcji Maillarda w bogatym w białka wnętrzu komórki. W celu weryfikacji powyższych przypuszczeń wykonano serię dodatkowych eksperymentów, których wyniki zostaną omówione w podrozdziale 5.4.3.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdzono, że najkorzystniejsze efekty zapewnia prowadzenie procesu w następujących warunkach:

- temperatura 80°C, w której wszystkie biokatalizatory wykazują wysoką aktywność, są bardziej stabilne, a reakcje Maillarda przebiegają mniej intensywnie, niż w temperaturach wyższych,

- pH 5,4, w którym wszystkie preparaty wykazują wysoką aktywność transglikozylacyjną, a które nie sprzyja powstawaniu produktów reakcji Maillarda (reakcje te przebiegają intensywniej w pH zasadowym [Martins i wsp., 2001]),
- stężenie każdego z substratów (laktozy i fruktozy) równe 10% w/v, które zapewnia wysoki uzysk laktulozy przy oszczędnym gospodarowaniu substratami,
- ilość biokatalizatora będąca ekwiwalentem 1,0 U/cm³ substratu dla obu preparatów immobilizowanych w alginianie wapnia, 3,0 U/cm³ substratu dla wolnych bakterii oraz 4,0 U/cm³ dla wolnej Pwβgal, pozwalająca uzyskać znaczne ilości laktulozy przy stosunkowo niewielkim zużyciu biokatalizatora.

Eksperyment, w którym badano wpływ aktywności β-galaktozydazy w środowisku reakcji na ilość syntetyzowanej laktulozy, wykazał ponadto, że wolne/immobilizowane komórki rekombinowanej *E. coli* są bardziej efektywnym producentem laktulozy niż wolna/immobilizowana podczyszczona Pwβgal. Dodatkowo, przy aktywnościach β-galaktozydazy w środowisku przekraczających 1,0 U/cm³, za sprawą wolnych biokatalizatorów uzyskiwano wyższe stężenia produktu w medium reakcyjnym, niż przy pomocy biokatalizatorów pułapkowanych w alginianie wapnia. W tych warunkach następowało rozcieńczanie substratu przez wodę zawartą w granulach biokatalizatora. Rezultaty te, wbrew wcześniejszym przypuszczeniom, sugerują, że wolny enzym/komórki są bardziej skutecznymi katalizatorami syntezy laktulozy niż ich immobilizowane odpowiedniki.

5.4.2. Wielokrotne wykorzystanie pojedynczej porcji biokatalizatora w oddzielnych reakcjach syntezy laktulozy

Podstawową korzyścią płynącą ze stosowania biokatalizatorów unieruchomionych jest możliwość ich wielokrotnego wykorzystania w odrębnych cyklach produkcyjnych. Wolne i immobilizowane w alginianie wapnia komórki *E. coli* zawierające Pwβgal oraz immobilizowany podczyszczony enzym porównano pod względem efektywności syntezy laktulozy w kolejnych 4-godzinnych szarżach produkcyjnych w temperaturze 80°C. W przypadku wolnych komórek oznaczono dodatkowo ilość białka oraz aktywność β-galaktozydazy wyciekającej z nich w każdym cyklu produkcyjnym do środowiska reakcji.

W temperaturze 80°C enzym/komórki pułapkowane w alginianie wapnia udało się wykorzystać w zaledwie 6 cyklach produkcyjnych (Rysunek 5.18.A.), przy czym w trakcie ostatniego cyklu granule złoża ulegały całkowitemu zniszczeniu. Na tak ograniczoną stabilność żelu wpływała nie tylko wysoka temperatura, ale także wszystkie operacje mechaniczne, którym poddawano złożę pomiędzy kolejnymi cyklami (odsączenie, przemywanie, suszenie na bibule, przenoszenie do świeżej porcji substratu). Już w trzecim cyklu produkcyjnym dało się ponadto zaobserwować spadek aktywności transglikozylacyjnej

wykazywanej przez unieruchomiony enzym. W szóstym cyklu preparat ten zachowywał jedynie około 30% aktywności początkowej. Utrata aktywności była rezultatem wypłukiwania enzymu ze złoża oraz destabilizacji granul biokatalizatora, co obserwowano także podczas wielu analogicznych procesów [na przykład: Girigowda i Mulimani, 2006; Haider i Husain, 2007; Zhou i wsp., 2010]. Efektu tego nie odnotowano podczas katalizowania kolejnych reakcji przez immobilizowane komórki. W przypadku wolnych komórek nieznaczna (o około 10%) utrata efektywności syntezy następowała dopiero w 6 cyklu produkcyjnym. Komórki mogły być zatem nadal stosowane. Najwięcej białka, $1,16 \pm 0,03$ mg/g wilgotnej biomasy, komórki uwalniały podczas pierwszego trwającego 4 godziny cyklu produkcyjnego, w kolejnych cyklach ta ilość malała do $0,168 \pm 0,005$ mg/g wilgotnych komórek w ostatnim cyklu (Rysunek 5.19.). Wartości te stanowiły odpowiednio 1,68 i 0,25% całkowitej zawartości białka w komórkach. Z drugiej strony, aktywność β -galaktozydazy w środowisku poza komórką zwiększała się. Po piątym cyklu wynosiła 0,67 U/g wilgotnej biomasy, co jednak stanowiło zaledwie 0,67% początkowej aktywności wykazywanej przez komórki *E. coli* z Pw β gal.

Preparaty immobilizowanego enzymu i komórek zastosowano dla porównania w procesie syntezy laktulozy prowadzonym w temperaturze 60°C (Rysunek 5.18.B.). W tych warunkach obydwie złoża wykazywały wyraźnie większą stabilność i praktycznie nie uległy zniszczeniu w trakcie 8 kolejnych cykli produkcyjnych. W niższej temperaturze także wypłukiwanie enzymu ze złoża następowało wolniej. W ostatnim cyklu immobilizowana Pw β gal zachowywała około 66% początkowej aktywności transglikozylacyjnej.

Obniżenie temperatury reakcji jest jednym ze sposobów pozwalających zwiększyć stabilność żelu alginianowego. W niższej temperaturze maleje jednak wydajność syntezy laktulozy. Inne możliwości to ograniczenie ilości operacji mechanicznych, którym poddawane jest złoże pomiędzy cyklami, zastosowanie do przygotowania żelu alginianu bogatszego w reszty kwasu α -L-guluronowego (reszty te silniej wiążą kationy wielowartościowe niż reszty kwasu β -D-mannuronowego; ich udział w strukturze polimeru bezpośrednio przekłada się na wytrzymałość żelu [Orive i wsp., 2006]) lub modyfikacja składu żelu innymi materiałami zwiększającymi jego stabilność.

5.4.3. Wpływ modyfikacji składu złoża alginianowego na jego trwałość

Skład złoża alginianowego poddano wybranym modyfikacjom w celu poprawienia jego stabilności mechanicznej (Tabela 5.4.). Stabilność otrzymanych biokatalizatorów sprawdzono podczas wielokrotnego wykorzystania pojedynczej porcji danego złoża w odrębnych cyklach syntezy laktulozy w temperaturze 60 (unieruchomiona Pw β gal) lub 80°C (unieruchomione bakterie).

Zwiększenie stężenia żelu alginianowego do 5% ograniczyło wypłukiwanie Pw β gal ze złoża podczas kolejnych cykli produkcyjnych. Dodatkowe usieciowanie enzymu aldehydem glutarowym nie

przyniosło poprawy właściwości złoża. Bardziej stężony żel był jednak mniej stabilny w warunkach reakcji. Po 6 cyklach produkcyjnych większość granул złoża pękała na pół, podczas gdy granule przygotowane z 3% alginianu zachowywały kształt nawet po 8 użyciach.

W przypadku immobilizowanych bakterii, wprowadzenie chitozanu lub tlenku glinu do złoża pogarszało stabilność biokatalizatora. Nieznaczłą poprawę trwałości żelu przyniosło natomiast wzbogacenie go o 2% żel krzemionkowy lub dodanie do środowiska reakcji 1 mM chlorku wapnia. Najkorzystniejsze okazało się zwiększenie zawartości alginianu w żelu do 5%. W przeciwieństwie do unieruchomionej Pwβgal, granule z bakteriami nie rozpadały się na dwie części. Jednak już po 7 cyklach syntezy laktulozy z użyciem tego biokatalizatora obserwowano zmętnienie medium reakcyjnego, świadczące o uwalnianiu komórek ze struktury żelu. W kolejnych cyklach było ono coraz wyraźniejsze.

Ponieważ żadna z zaproponowanych modyfikacji złoża alginianowego nie poprawiła zasadniczo jego stabilności mechanicznej podczas wielokrotnej syntezy laktulozy katalizowanej za pomocą pojedynczej porcji danego biokatalizatora, zrezygnowano z wprowadzania zmian w składzie stosowanego nośnika.

5.4.4. Porównanie aktywności hydrolitycznej względem laktozy oraz termostabilności Pwβgal podczyszczonej lub mikrokapsułkowanej w komórkach *E. coli*

Porównanie aktywności hydrolitycznej podczyszczonej Pwβgal i wolnych komórek z Pwβgal względem laktozy, jak również termostabilności obu preparatów w środowisku niezawierającym/zawierającym cukry redukujące, okazało się konieczne w celu wyjaśnienia spadku aktywności transglikozylacyjnej komórek w temperaturach powyżej 80°C oraz większej skuteczności komórek niż enzymu w reakcji syntezy laktulozy.

Przypuszczano, że obniżenie aktywności transglikozylacyjnej komórek w temperaturach powyżej 80°C mogło być konsekwencją wzrostu aktywności hydrolitycznej Pwβgal zamkniętej w komórkach w tych warunkach. Eksperyment, w którym zbadano, czy podwyższenie temperatury z 80 do 90°C faworyzuje reakcję hydrolizy 3% w/v laktozy wykazał, że we wszystkich analizowanych mieszaninach reakcyjnych rosło stężenie galaktozy i było ono tym wyższe, im wyższa temperatura i im dłużej trwała reakcja (Tabela 5.5.). Pomimo tego i pomimo niskiego stężenia substratu w środowisku reakcji, Pwβgal i komórki syntetyzowały tGOS, a transglikozylacja przeważała nad hydrolizą. Świadczył o tym iloraz $(C_{Glc}-C_{Gal})/C_{Gal}$, którego licznik (czyli różnica stężeń glukozy i galaktozy w medium po reakcji) wyraża ilość galaktozy uczestniczącej w reakcji transglikozylacji, a mianownik ilość galaktozy uwolnionej w reakcji hydrolizy (im mniejsza wartość ilorazu, tym stężenie galaktozy w środowisku jest bliższe stężeniu glukozy i tym większa przewaga hydrolizy nad transglikozylacją). W przypadku

podczyszczanego enzymu i komórek, w obu badanych temperaturach, wartość ilorazu była większa od 2, czyli dwukrotnie więcej reszt galaktozy zostało przeniesionych na akceptor inny niż woda. W 90°C wartość ilorazu była nieznacznie niższa, w porównaniu z tą w temperaturze 80°C. Również w obu temperaturach wartość ta, po osiągnięciu pewnego maksimum, nieznacznie malała przy dłuższych czasach reakcji. Wartość $(C_{\text{Glc}} - C_{\text{Gal}})/C_{\text{Gal}}$ wskazywała również, że komórki *E. coli* z Pw β gal katalizowały transglikozylację wydajniej, niż równoważna ilość podczyszczanego enzymu. Uzyskane rezultaty sugerują, że w temperaturze 80 i 90°C reakcja transglikozylacji jest przemianą przebiegającą efektywniej, a towarzysząca jej hydroliza, przy odpowiednio krótkim czasie reakcji, nie wywiera decydującego wpływu na końcowy uzysk produktu/ów transglikozylacji. Obniżenie wydajności syntezy laktulozy katalizowanej przez wolne/unieruchomione komórki *E. coli* z Pw β gal w temperaturach powyżej 80°C musiało być zatem spowodowane dodatkowymi czynnikami.

Zbadano następnie wpływ przedłużonej inkubacji Pw β gal i bakterii w temperaturze 80 lub 90°C i w obecności 1% glukozy na aktywność β -galaktozydazy wykazywaną przez te biokatalizatory (Tabela 5.6.). Najbardziej interesującym i zaskakującym rezultatem tego eksperymentu było odnotowanie 76% i 30-50% wzrostu aktywności β -galaktozydazy wykazywanej przez komórki w trakcie pierwszych dwóch godzin inkubacji w temperaturze odpowiednio 80 i 90°C. Prawdopodobnie podczas inkubacji pod wpływem temperatury Pw β gal zamknięta w komórkach ulegała zmianom konformacyjnym, których efektem było zwiększenie aktywności enzymatycznej tych komórek [Pisani i wsp., 1990]. Zarówno enzym, jak i komórki, charakteryzowały się nadzwyczajnie wysoką termostabilnością. Po 120 godzinach inkubacji w buforze octanowym pH 5,4 w temperaturze 80 lub 90°C, Pw β gal zachowywała odpowiednio 80 i 57%, a komórki 130 i 83% aktywności początkowej. Termostabilność obu preparatów ulegała jednak wyraźnemu pogorszeniu w obecności 1% w/v glukozy w środowisku. W 80°C okres połowicznej utraty początkowej aktywności wynosił 96 i 105 godzin, odpowiednio dla enzymu i komórek, a w 90°C już tylko 43 i 31 godzin. Dezaktywacja była prawdopodobnie następstwem reakcji Maillarda, ponieważ w miarę upływu czasu inkubacji obserwowano coraz intensywniejsze brunatnienie badanych próbek. W mikrokapsułkach komórek bakteryjnych, ze względu na wysoką zawartość innych białek otaczających Pw β gal, reakcje te mogły przebiegać intensywniej i powodować szybszą inaktywację enzymu. Obniżenie aktywności obu biokatalizatorów podczas syntezy laktulozy, w środowisku znacznie bogatszym w cukry redukujące, następowało przypuszczalnie o wiele szybciej. Reakcje Maillarda były też przyczyną około dwukrotnie szybszej, w porównaniu z utratą aktywności tylko pod wpływem temperatury, inaktywacji β -glikozydazy z *Pyrococcus furiosus* w temperaturze powyżej 80°C w obecności cukrów [Bruins i wsp., 2003a].

Obserwowany wzrost aktywności β -galaktozydazy w komórkach pod wpływem temperatury w początkowym okresie inkubacji wyjaśnił, dlaczego komórki *E. coli* z Pw β gal syntetyzowały laktulozę skuteczniej niż wyizolowany enzym, gdy wyjściowa aktywność obu biokatalizatorów w mieszaninie reakcyjnej była równa. Rzeczywista aktywność β -galaktozydazy w środowisku reakcji, dzięki temu zjawisku, była bowiem znacznie wyższa. Bardziej wnikliwa analiza zmian aktywności Pw β gal w komórkach w trakcie ogrzewania w 80°C wykazała, że 30 minutowa inkubacja w tych warunkach wystarczała, by uzyskać maksymalną aktywność enzymatyczną komórek (Rysunek 5.20.). Podczas dalszych eksperymentów, przed oznaczeniem aktywności lub przygotowaniem immobilizowanych bakterii, rekombinowane komórki *E. coli* poddawano preinkubacji (80°C, 30 min) w celu ich „aktywacji”.

5.4.5. Porównanie różnych form Pw β gal pod względem wydajności syntezy laktulozy

Przy udziale równoważnych ilości wolnej/unieruchomionej Pw β gal oraz wolnych/unieruchomionych bakterii, w warunkach, które uznano za najkorzystniejsze (10% w/v laktozy, 10% w/v fruktozy, 80°C, pH 5,4), przeprowadzono syntezę laktulozy w celu porównania wszystkich badanych biokatalizatorów pod względem efektywności i ustalenia optymalnego czasu syntezy. Zawartość każdej z form Pw β gal w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 1,0 U/cm³. Przy tej aktywności, w przypadku biokatalizatorów immobilizowanych, efekt rozcieńczania nie wywierał decydującego wpływu na końcowy uzysk laktulozy. Rekombinowane komórki *E. coli*, przed reakcją lub immobilizacją poddawano 30 minutowej preinkubacji w 80°C.

Na rysunkach 5.21.A-D, oprócz stężeń laktulozy, glukozy, galaktozy i fruktozy obliczonych na podstawie odpowiadających im pików chromatograficznych, przedstawiono także stężenia laktozy i tGOS w próbkach. Wartości te oszacowano odpowiednio na podstawie różnicy pomiędzy początkowym stężeniem molowym laktozy i stężeniem molowym glukozy w medium poreakcyjnym [$C_{Lac}(i) = C_{Lac}(0) - C_{Glc}(i)$] oraz różnicy pomiędzy stężeniami molowymi glukozy i galaktozy w środowisku po reakcji [$C_{tGOS}(i) = C_{Glc}(i) - C_{Gal}(i)$]. Jak wyjaśniono w podrozdziale 5.2., w zastosowanym układzie analitycznym laktoza oraz powstające w trakcie reakcji disacharydy inne niż laktuloza nie ulegały separacji, w związku z czym ich oznaczenie nie było możliwe. Oszacowana zawartość laktozy jest zawyżona w stosunku do rzeczywistej, ponieważ nie uwzględnia laktozy, która została wykorzystana jako akceptor reszty galaktozylowej w syntezie tGOS. Przeliczenie to, że nie pokazuje również wzrostu stężenia laktozy w mieszaninach z unieruchomionymi biokatalizatorami spowodowanego uzupełnianiem objętości mieszaniny świeżą porcją substratu po pobraniu próbki do analizy. Uzupełnianie medium reakcyjnego było podyktowane koniecznością zachowania stałej aktywności β -galaktozydazy w środowisku reakcji.

Przy udziale unieruchomionych bakterii synteza laktulozy przebiegała najszybciej. Już po 5 godzinach reakcji stężenie laktulozy w mieszaninie reakcyjnej wynosiło $17,6 \pm 0,6$ g/dm³, a po kolejnych 3 godzinach osiągało wartość maksymalną równą $18,2 \pm 0,6$ g/dm³. W tym samym czasie (8 godzin) wolne bakterie oraz wolny lub immobilizowany enzym produkowały odpowiednio $16,1 \pm 1,3$; $14,0 \pm 0,3$ oraz $15,0 \pm 0,4$ g/dm³ laktulozy. Dwa ostatnie biokatalizatory podczas całej 30-godzinnej reakcji nie zdołały zsyntetyzować tyle produktu, co immobilizowane bakterie. Wolne bakterie potrzebowały na to aż 24 godzin ($18,6 \pm 0,8$ g/dm³). W hydrolizacie otrzymanym za pomocą immobilizowanych bakterii znajdowało się też najwięcej produktów hydrolizy laktozy oraz tGOS. Co ciekawe, pomimo wysokiej temperatury i wydłużonego czasu reakcji, granule biokatalizatorów immobilizowanych nie ulegały zniszczeniu (podlegały jednak brunatnieniu). Potwierdza to wcześniej wyciągnięty wniosek, że na ich stabilność, oprócz temperatury, wpływały także operacje mechaniczne, którym były poddawane.

Pośród wszystkich badanych biokatalizatorów, wolne oraz immobilizowane rekombinowane komórki *E. coli* posiadające aktywność β -galaktozydazy z *P. woesei*, okazały się najbardziej interesującymi. Unieruchomione bakterie syntetyzowały najwięcej laktulozy i w najkrótszym czasie, jednak równocześnie w mieszaninie reakcyjnej powstawały znaczne ilości tGOS oraz produktów rozkładu laktozy. Procentowy udział molowy laktulozy oraz tGOS w produktach (glukoza, galaktoza, laktuloza, tGOS) po 8 godzinach reakcji wynosił jednak odpowiednio 14-18 oraz 24-25%, bez względu na użyty biokatalizator (także wolny/unieruchomiony enzym). Wolne komórki wydawały się być biokatalizatorem bardziej uniwersalnym niż immobilizowane. Wykazywały bowiem większą odporność na stres temperaturowy i mechaniczny, mogły być stosowane w bardzo szerokim zakresie aktywności (komórki immobilizowane właściwie tylko w ilości równoważnej 1,0 U/cm³ substratu), nie powodując przy tym rozcieńczenia substratu, oraz były mniej kosztowne. Z drugiej strony, komórki immobilizowane w alginianie wapnia zapewniały łatwiejsze oddzielenie biokatalizatora od mieszaniny poreakcyjnej oraz pozwalały na stosowanie ich jako wypełnienia przepływowego reaktora kolumnowego.

5.4.6. Synteza laktulozy w reaktorze kolumnowym wypełnionym komórkami *E. coli* z Pw β gal immobilizowanymi w alginianie wapnia

Jak wspomniano w poprzednim podrozdziale, komórki unieruchomione na nierozpuszczalnym nośniku, w przeciwieństwie do komórek wolnych, mogą być stosowane jako wypełnienie przepływowych reaktorów kolumnowych. Podjęto zatem próbę wykorzystania komórek *E. coli* z Pw β gal jako katalizatora syntezy laktulozy prowadzonej w reaktorze kolumnowym. W procesie tym nie zastosowano podczyszczonej Pw β gal immobilizowanej w alginianie wapnia, ponieważ podczas wielokrotnego wykorzystania złoża enzym ulegał wypłukiwaniu ze struktury żelu (podrozdział 5.4.2.), co najprawdopodobniej następowałoby także w trakcie ciągłej pracy reaktora kolumnowego. Ponadto,

biokatalizator ten wykazywał mniejszą efektywność syntezy laktulozy niż unieruchomione komórki (podrozdział 5.4.5.). Reakcję prowadzono metodą ciągłą z recyrkulacją substratu przez złożę. Taki system pozwolił na osiągnięcie wysokich wydajności w reakcjach syntezy tagatozy [Hong i wsp., 2007; Jung i wsp., 2005] oraz trehalozy [Di Lernia i wsp., 2002] katalizowanych przez unieruchomione w alginianie wapnia rekombinowane komórki *E. coli* posiadające aktywności różnych termofilnych enzymów.

Wbrew oczekiwaniom, w zastosowanych warunkach (10% w/v laktozy, 10% w/v fruktozy, 100 cm³; 1,0 U/cm³ substratu; pH 5,4; 60 lub 80°C; przepływ 1,5 cm³/min) synteza laktulozy w reaktorze kolumnowym przebiegała mniej efektywnie, niż w systemie okresowym (Rysunek 5.22.). Ilość laktulozy (około 18 g/dm³), którą w 80°C unieruchomione komórki produkowały w ciągu 8 godzin reakcji, w reaktorze uzyskiwano dopiero po 16 godzinach. W tej temperaturze po 8 godzinach reakcji uzysk laktulozy wynosił 14,6±0,2 g/dm³, a po 24 godz 21,6±0,01 g/dm³, co odpowiadało produktywnościom równym 1,8 i 0,9 g/dm³/godz. W 60°C wartości te malały odpowiednio do 1,09 i 0,65 g/dm³/godz. W porównaniu z maksymalną produktywnością osiąganą w procesie okresowym (2,3 g/dm³/godz), rezultaty te uznano za mało obiecujące. Niskie uzyski laktulozy były prawdopodobnie skutkiem pogorszonej wymiany masy w układzie, będącej następstwem pęcznienia granул żelu alginianu wapnia w podwyższonej temperaturze [Mammarella i Rubiolo, 2009]. Poprawę wydajności przemiany mogłaby przynieść zmiana konstrukcji reaktora (zwiększenie wysokości złoża) lub szybkości przepływu substratu przez złożę. Korzyścią wynikającą ze stosowania reaktora było natomiast to, że pomimo długiego czasu reakcji, granule biokatalizatora nie ulegały uszkodzeniu, nie obserwowano też mętnienia substratu, świadczącego o uwalnianiu komórek ze struktury żelu.

Ponieważ transport masy w reaktorach barbotażowych ze złożem fluidalnym następuje efektywniej, niż w reaktorach kolumnowych [Gòdia i Solà, 1995], dla porównania syntezę laktulozy przeprowadzono w reaktorze tego typu w analogicznych warunkach. Wstępny eksperyment wykazał, że w reaktorze barbotażowym zarówno w 60, jak i w 80°C, reakcja przebiegała wydajniej. W niższej temperaturze uzyskiwano 18,5±0,4 i 24,5±0,2 g/dm³ laktulozy po 8 i 24 godzinach procesu, zaś w wyższej odpowiednio 20,5±0,3 i 25,0±0,1 g/dm³. Wydajności te były także wyższe, niż w reakcji okresowej. Uzysk laktulozy w 60°C sugerował, że dzięki zastosowaniu barbotażu możliwe byłoby obniżenie temperatury reakcji, a tym samym jej kosztu, przy zachowaniu jednakowej efektywności syntezy, co w małej skali. Otrzymywanie laktulozy w reaktorze barbotażowym poddano zatem wnikliwszej analizie.

5.4.7. Synteza laktulozy w reaktorze barbotażowym ze złożem fluidalnym w postaci immobilizowanych w alginianie wapnia komórek *E. coli* z Pwβgal

Jak wspomniano w poprzednim podrozdziale, granule alginianu wapnia pęcznią w podwyższonych temperaturach, co zwiększa upakowanie biokatalizatora i może pogarszać warunki wymiany masy w układzie, a tym samym obniżyć wydajność przemiany. Sposobem, pozwalającym przezwyciężyć wymienione trudności, wydaje się być stosowanie reaktorów barbotażowych ze złożem fluidalnym, w których przepływ pęcherzyków gazu zapewnia wydajne i jednocześnie łagodne mieszanie medium reakcyjnego. W reaktorach tego typu wymiana masy następuje efektywniej, niż w reaktorach kolumnowych ze złożem upakowanym [Gòdia i Solà, 1995]. W laboratoryjnym reaktorze barbotażowym, o objętości roboczej równej 200 cm³, przeprowadzono próbę otrzymywania laktulozy z zastosowaniem immobilizowanych w alginianie wapnia komórek *E. coli* posiadających aktywność termofilnej β-galaktozydazy z *P. woesei*. Proces prowadzono metodą okresową, ponieważ w trybie ciągłym, pomimo stosunkowo wolnego (1,0 cm³/min) przepływu substratu przez reaktor, osiągnęto znikome wydajności reakcji (dane nieprezentowane). Prawdopodobnie w tym trybie czas przebywania substratu w reaktorze był zbyt krótki, by zapewnić odpowiedni kontakt substratu z biokatalizatorem. Z przyczyn technicznych, dalsze zmniejszenie prędkości przepływu substratu przez reaktor było niewykonalne.

Synteza laktulozy w reaktorze barbotażowym przebiegała najefektywniej w temperaturze 70°C (Rysunek 5.23.). Po 24 godzinach od rozpoczęcia reakcji stężenie produktu w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 15,2 g/dm³ i przez kolejnych 16 godzin procesu pozostawało bez zmian. W temperaturach 80 i 90°C uzyskiwano mniejsze ilości laktulozy, co przypuszczalnie było spowodowane dezaktywacją enzymu w następstwie reakcji Maillarda. W tych warunkach obserwowano bowiem brunatnienie granул złoża oraz medium reakcyjnego. W 60°C otrzymano 14,0 g/dm³ po 24 i 15,5 g/dm³ po 40 godzinach reakcji, przy czym, inaczej niż w temperaturach wyższych, w ciągu całego procesu nie obserwowano tu uszkodzeń granул złoża. Przyjęto zatem, że prowadzenie syntezy w 60°C przez 24 godziny było najkorzystniejsze i takie parametry stosowano podczas dalszych reakcji.

Podobnie, jak w przypadku reakcji okresowych prowadzonych w mniejszej skali (podrozdział 5.4.1.), w obecności większych ilości biokatalizatora niż ekwiwalent 1,0 U/cm³ substratu, obserwowano rozcieńczanie medium reakcyjnego wodą zamkniętą w porach żelu alginianowego (Rysunek 5.24.). Wykorzystanie w syntezie laktulozy barbotażu, nie poprawiło warunków wymiany masy na tyle, by chociażby częściowo zniwelować ten efekt. Końcowe stężenia laktulozy osiągnęte przy udziale 0,5 i 1,0 U/cm³ biokatalizatora były bardzo zbliżone, ale przy wyższej spośród tych dwóch zawartości złoża w środowisku reakcja przebiegała szybciej.

Poprawę uzysku laktulozy w procesie przyniosło zwiększenie początkowego stężenia laktozy od 5 do 10% w/v i stężenia fruktozy od 5 do 15% w/v (Rysunek 5.25. A i B). Różnica pomiędzy

wydajnościami uzyskiwanymi przy 10 i 15% zawartości fruktozy w medium reakcyjnym była jednak na tyle niewielka, (odpowiednio 23,3 i 26,4 g/dm³), że niższe stężenie substratu, ze względu na jego mniejsze zużycie, uznano za korzystniejsze.

W optymalnych warunkach, tzn. w 60°C, w obecności 1,0 U/cm³ biokatalizatora i przy początkowym stężeniu laktozy i fruktozy równym 10% w/v, badane złożo udało się trzykrotnie wykorzystać do produkcji laktulozy w reaktorze barbotażowym (Rysunek 5.26.). W czwartym 24-godzinnym cyklu produkcyjnym, pomimo stosunkowo łagodnych warunków reakcji, granule biokatalizatora ulegały zniszczeniu. W kolejnych cyklach uzyskiwano 24,1, 22,9 i 20,3 g/dm³ laktulozy, co odpowiadało produktywnościom 1,0, 0,95 i 0,84 g/dm³/godz. Produktywności te, w porównaniu z 4,1 g/dm³/godz osiąganą podczas otrzymywania tagatozy z galaktozy za pomocą immobilizowanych w alginianie wapnia komórek *E. coli* posiadających aktywność izomerazy L-arabinozowej z *Thermotoga neapolitana* [Hong i wsp., 2007], były niesatysfakcjonujące i wymagały wprowadzenia zmian w procesie w celu ich poprawienia.

Dla porównania, syntezę laktulozy w reaktorze barbotażowym przeprowadzono też przy udziale zawiesiny komórek w identycznych warunkach (Rysunek 5.27.). Reakcja katalizowana przez wolne komórki *E. coli* z Pwβgal, podobnie jak w trakcie syntezy laktulozy w mniejszej skali, przebiegała wolniej i z nieco niższą wydajnością (11,2 i 14,5 g/dm³ laktulozy po 24 i 40 godzinach reakcji) niż w przypadku bakterii immobilizowanych. Należy jednak zaznaczyć, że stosowanie zawiesiny komórek pozwala na zwiększenie aktywności β-galaktozydazy w medium reakcyjnym (niewystępowanie efektu rozcieńczenia) oraz podwyższenie temperatury reakcji (brak ograniczeń wynikających z wrażliwości żelu alginianowego na temperaturę i bodźce mechaniczne), co poprawiłoby zapewne uzysk produktu.

5.4.8. Podsumowanie

Podczas wszystkich przeprowadzonych reakcji transglikozylacji, wolne/ unieruchomione komórki *E. coli* z termofilną β-galaktozydazą z *Pyrococcus woesei* wykazywały lepsze właściwości katalityczne niż wolny/unieruchomiony podczyszczony enzym. Ponadto, w przeciwieństwie do podczyszczonej Pwβgal, komórki nie ulegały wyplukiwaniu ze struktury żelu alginianowego podczas wielokrotnej syntezy laktulozy z użyciem pojedynczej porcji biokatalizatora. W jednakowych warunkach procesu bakterie pułapkowane w alginianie wapnia produkowały więcej laktulozy niż wolne, co prawdopodobnie wynikało z tego, że podczas przedłużonej inkubacji z substratem w reakcję zaangażowane były nie tylko komórki unieruchomione bezpośrednio pod powierzchnią granul złoża (jak to miało miejsce w reakcjach z oNPβGal), ale również te zamknięte w głębszych warstwach żelu. W zestawieniu z innymi enzymami posiadającymi zdolność do katalizowania syntezy laktulozy, badane

preparaty Pw β gal prezentowały porównywalny potencjał katalityczny (Tabela 5.7.). Świadczyła o tym zbliżona produktywność biokatalizatorów wyrażona w gramach laktulozy syntetyzowanej w jednostce czasu przez jednostkę aktywności danego enzymu. Parametr ten był znacznie wyższy tylko w przypadku β -galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* badanej przez Adamczyka i wsp. [2009]. Co ciekawe, Mayer i wsp. [2004], którzy analizowali właściwości tego samego enzymu, uzyskali produktywności ponad 5-krotnie niższe. Preparaty Pw β gal pod względem wydajności produktu odniesionej do początkowego stężenia laktozy w medium reakcyjnym (C_{Lu}/C_{Lac}) ustępowały β -glikozydazie z *Pyrococcus furiosus* oraz β -galaktozydazie z *Aspergillus oryzae* [Mayer i wsp., 2004], były natomiast efektywniejsze od β -galaktozydazy z *Sulfolobus solfataricus* [Kim i wsp., 2006] oraz permeabilizowanych drożdży *Kluyveromyces lactis* [Lee i wsp., 2004].

Poprawy wydajności syntezy laktulozy z udziałem immobilizowanych w alginianie wapnia komórek *E. coli* z Pw β gal nie przyniosło zastosowanie ich jako wypełnienia reaktora kolumnowego lub złoża fluidalnego w reaktorze barbotażowym. Produktywności osiągane w tych procesach były jednakowe, co w reakcjach prowadzonych w mniejszej skali (reaktor kolumnowy: 1,83 g/dm³/godz w 80°C; reaktor barbotażowy: 2,3 g/dm³/godz w 60°C; 10% laktozy i 10% fruktozy, 1,0 U/cm³ substratu, pH 5,4, 8 godz), ale kilkakrotnie niższe w porównaniu z produktywnością przypadającą na jednostkę objętości reaktora kolumnowego uzyskaną w procesie ciągłym katalizowanym przez β -glikozydazę z *Pyrococcus furiosus* unieruchomioną na Amberlicie IRA-93 (45-65 g/dm³/godz laktulozy) [Mayer i wsp., 2010].

Pozostawienie rekombinantowego enzymu we wnętrzu modyfikowanej genetycznie komórki wytwarzającej go stanowi rodzaj unieruchomienia biokatalizatora. Dodatkowa immobilizacja komórek na nierozpuszczalnym nośniku jest uzasadniona tylko w razie stosowania takiego preparatu jako wypełnienia reaktora kolumnowego. Ponieważ synteza laktulozy w reaktorze kolumnowym i barbotażowym przebiegała mało efektywnie, uznano, że bardziej racjonalne będzie prowadzenie wspomnianego procesu metodą okresową przy udziale wolnych komórek jako katalizatorów. Co prawda w reakcjach okresowych uzyski laktulozy osiągane za sprawą immobilizowanych komórek były wyższe niż w obecności wolnych, jednak za tymi drugimi przemawia ich niższy koszt (brak nośnika, mniejsze zużycie komórek), a także możliwość stosowania w szerszym zakresie temperatur (brak ograniczeń powodowanych przez wrażliwość termiczną i mechaniczną alginianu) i aktywności (brak efektu rozcieńczenia substratu). Pojedyncza porcja wolnych komórek mogłaby zostać kilkakrotnie wykorzystana do syntezy laktulozy, jednak z punktu widzenia powtarzalności procesu lepiej w każdym cyklu produkcyjnym stosować świeżą porcję. W przypadku tak niedrogiego biokatalizatora, jak całe komórki, jest to wykonalne.

Komórki *E. coli* BL21(DE3) z Pw β gal nie są patogenne, w warunkach proponowanego procesu ulegają szybkiej inaktywacji, a ich wewnątrzkomórkowe białka w minimalnym stopniu przedostają się do medium reakcyjnego, jednak stosowanie tych bakterii do wytwarzania jadalnych oligosacharydów może budzić obawy odnośnie bezpieczeństwa zdrowotnego produktu finalnego. Szczepy *E. coli* nie posiadają bowiem statusu QPS (ang. Qualified Presumption of Safety), tzn. rekomendacji Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) dla mikroorganizmów mogących stanowić dodatek do żywności lub pasz, lub mogących służyć do produkcji rekombinantowych enzymów wykorzystywanych w przetwórstwie spożywczym [European Food Safety Authority, 2008; Leuschner i wsp., 2010]. Częściowe rozwiązanie tego problemu zapewnia zastąpienie bakterii drożdżami *Pichia pastoris* modyfikowanymi genem termofilnej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei*. Drożdże *P. pastoris* są niepatogenne, posiadają długą historię bezpiecznego stosowania m.in. do otrzymywania wielu rekombinantowych białek [Cregg i wsp., 2000] i, zgodnie z obecnymi regulacjami, mogą służyć do wytwarzania rekombinantowych enzymów używanych w produkcji żywności [European Food Safety Authority, 2008]. Modyfikowane drożdże z Pw β gal są również bardziej stabilne genetycznie w porównaniu z komórkami *E. coli*, gdyż gen kodujący termofilną β -galaktozydazę został zintegrowany z ich genomowym DNA (w przypadku bakterii gen ten znajduje się na plazmidzie). Potencjał katalityczny Pw β gal mikrokapsułkowanej w komórkach *P. pastoris* porównano zatem z właściwościami wolnego i unieruchomionego w alginianie wapnia podczyszczonego enzymu oraz wolnych/immobilizowanych rekombinowanych komórek *E. coli*.

5.5. Charakterystyka Pw β gal mikrokapsułkowanej w komórkach *Pichia pastoris*

Komórki *P. pastoris* wykazywały znacznie niższą, w porównaniu z *E. coli*, aktywność rekombinantowej β -galaktozydazy. Wynosiła ona 20 U/g wilgotnej biomasy, czyli około 20% aktywności posiadanej przez bakterie. Komórki drożdżowe są jednak większe od bakteryjnych, zatem w jednostce masy ich ilość jest mniejsza. Permeabilizacja etanolem lub izopropanolem nie zwiększała aktywności β -galaktozydazy w zawiesinie komórek (Tabela 5.8.). Działanie 50 i 75% alkoholi powodowało częściową lizę komórek, o czym świadczyły znaczne ilości białka wyciekającego z nich po permeabilizacji oraz wzrost intensywności fluorescencji jodku propidyny. Nieznaczny wzrost aktywności następował natomiast po inkubacji komórek w temperaturach wyższych niż 70°C. Temperatura w znacznie mniejszym stopniu, w porównaniu z 50-75% etanolem i izopropanolem, wpływała na ilość białka uwalnianego przez komórki. Zwiększała za to intensywność fluorescencji jodku propidyny, wskazującą na naruszenie integralności błony cytoplazmatycznej komórek. Podwyższona temperatura, podobnie jak w przypadku bakterii, okazała się wystarczającym czynnikiem permeabilizującym.

Komórki *P. pastoris* z Pw β gal wykazywały najwyższą aktywność hydrolityczną względem oNP β Gal w temperaturze 98-100°C (Rysunek 5.28.B.), a zatem w wyższej niż podczyszczona Pw β gal i komórki *E. coli*, oraz w pH 5,4, czyli tym samym, co wolna Pw β gal (Rysunek 5.28.A.). Enzym mikrokapsułkowany w komórkach drożdżowych zachowywał wysoką aktywność w znacznie szerszym, w porównaniu z preparatem podczyszczonym, zakresie pH (powyżej 80% aktywności maksymalnej w pH 4,0-6,0).

Trwająca 30 minut inkubacja zawiesiny drożdży w 80°C powodowała wzrost aktywności β -galaktozydazy w komórkach o ponad 80% (do 35 U/g). Podczas przedłużonej inkubacji w temperaturze 80°C Pw β gal zamknięta w komórkach drożdżowych była równie stabilna, co ta w komórkach bakteryjnych (Tabela 5.9.). W temperaturze 90°C traciła aktywność szybciej, i po 120 godz inkubacji wykazywała 55% aktywności początkowej, podczas gdy komórki *E. coli* aż 83%. Komórki *P. pastoris* z Pw β gal okazały się nieco odporniejsze na dezaktywację pod wpływem reakcji Maillarda. W obecności 1% glukozy ich czas połowicznej utraty aktywności wynosił ponad 120 oraz 33 godziny w temperaturze odpowiednio 80 i 90°C. Aktywność *E. coli* malała o 50% po 105 i 31 godzinach.

W czasie 48-godzinnej inkubacji zawiesiny bakterii i drożdży w 80°C następowało wyciekanie białka z komórek (Tabela 5.10.). Po 48 godzinach z 1 g wilgotnych komórek bakteryjnych wypływało około 3,3 mg białka, a z drożdżowych 1,3 mg. Ilość ta w obu przypadkach stanowiła zaledwie około 4,8% całkowitej zawartości białka w komórkach oszacowanej na podstawie ich lizy zasadowej (odpowiednio 69 \pm 2 oraz 28 \pm 1 mg/g wilgotnej biomasy). Także aktywność termofilnej β -galaktozydazy w środowisku poza komórką stanowiła mniej niż 1% aktywności wykazywanej przez komórki po 30-minutowej inkubacji w 80°C. Analiza elektroforetyczna spektrum mas cząsteczkowych białek wyekstrahowanych z komórek podczas wydłużonej inkubacji w 80°C nie wykazała jednak obecności wewnątrzkomórkowych protein *P. pastoris* i *E. coli* w ekstrakcie (Rysunek 5.29.).

Podczas hydrolizy 3% w/v laktozy katalizowanej przez komórki *P. pastoris* z Pw β gal, podobnie jak w przypadku β -galaktozydazy wolnej i zamkniętej w komórkach *E. coli*, następowała synteza tGOS (Tabela 5.11.). Co więcej, transglikozylacja była reakcją dominującą zarówno w 80, jak i 90°C, pomimo niskiego stężenia substratu. W wyższej temperaturze komórki *P. pastoris* z Pw β gal uwalniały więcej galaktozy, dlatego przewaga transglikozylacji nad hydrolizą była nieco niższa niż w 80°C. Na podstawie ilorazu $(C_{Glc}-C_{Gal})/C_{Gal}$ stwierdzono, że komórki *P. pastoris* z Pw β gal w 80°C katalizowały transglikozylację efektywniej, niż podczyszczony enzym lub rekombinowane komórki *E. coli*. W 90°C efektywność wszystkich wymienionych form β -galaktozydazy była jednakowa.

W celu porównania komórek *P. pastoris* z Pw β gal z pozostałymi badanymi biokatalizatorami, rekombinowane drożdże w ilości równoważnej 1 U/cm³ zastosowano jako katalizator syntezy laktulozy

w warunkach uznanych wcześniej za najkorzystniejsze (10% w/v laktozy i 10% w/v fruktozy; 80°C; pH 5,4) (Rysunek 5.30.). Końcowy uzysk laktulozy osiągnięty przy użyciu drożdży był wyższy, niż w przypadku innych badanych biokatalizatorów, i wynosił $22,5 \pm 1,22$ g/dm³ po 30 godzinach reakcji. Przemiana przebiegała jednak z wolniej. Po 8 godzinach reakcji stężenie produktu w mieszaninie reakcyjnej równe było $14,8 \pm 0,57$ g/dm³, podczas gdy w tym samym czasie wolne bakterie syntetyzowały $16,1 \pm 1,25$ g/dm³, a unieruchomione $18,2 \pm 0,49$ g/dm³ laktulozy. Na tym etapie reakcji molowy udział laktulozy w produktach przemiany (glukoza, galaktoza, laktuloza, tGOS) wynosił blisko 20%, a tGOS 22%. Rekombinowane drożdże katalizowały zatem reakcję z nieco większą selektywnością niż pozostałe formy Pwβgal. Produktywność tego biokatalizatora po 8 godzinach reakcji równa była 1,9 g/dm³/godz, czyli 0,0019 g/U/godz, zaś wydajność względna przemiany (odniesiona do początkowego stężenia laktozy w medium reakcyjnym) 14,8%. Wymienione wartości były bliskie tym osiąganym przy udziale wolnej oraz unieruchomionej w alginianie wapnia Pwβgal, ale niższe w porównaniu z efektywnością wolnych i unieruchomionych komórek *E. coli*.

Rekombinowane komórki *P. pastoris* z Pwβgal pod względem posiadanych właściwości (optymalna temperatura i zakres pH, termostabilność, efektywność katalizowania transglikozylacji) stanowiły biokatalizator równie przydatny, co komórki *E. coli* z termofilną β-galaktozydazą. Ponieważ jednak wykazywały dużo niższą aktywność β-galaktozydazy (około 20% aktywności bakterii), ich zużycie w trakcie reakcji musiało być proporcjonalnie większe. Przy udziale rekombinowanych drożdży synteza laktulozy przebiegała z mniejszą szybkością, ale za to bardziej selektywnie.

5.6. Zastosowanie różnych form Pwβgal do syntezy tGOS z laktozy

Rekombinantową β-galaktozydazę z *P. woesei* we wszystkich badanych postaciach (podczyszczony enzym, wolne komórki *E. coli* lub *P. pastoris* z Pwβgal, enzym lub komórki *E. coli* z Pwβgal immobilizowane w alginianie wapnia) wykorzystano jako katalizator syntezy tGOS z laktozy. Reakcję prowadzono w podobnych warunkach, co syntezę laktulozy (15% w/v laktozy; 80°C; pH 5,4; zawartość biokatalizatora 1,0 U/cm³ substratu). Stężenia tGOS przedstawione na rysunku 5.31. są wartościami szacunkowymi, obliczonymi na podstawie różnicy stężeń molowych glukozy i galaktozy. Przyjęto takie przybliżenie, ponieważ w stosowanym układzie analitycznym laktoza oraz powstające podczas reakcji disacharydy nie ulegały separacji, zatem ich oznaczenie chromatograficzne było niewykonalne. W podobny sposób obliczono pozostałość laktozy w próbkach.

Podczas syntezy laktulozy najwyższą skutecznością cechowały się komórki *E. coli* unieruchomione w alginianie wapnia, które produkowały najwięcej laktulozy w najkrótszym czasie (8 godzin). W przypadku syntezy tGOS, po 8 godzinach reakcji efektywność biokatalizatorów układała się następująco: immobilizowane bakterie > wolne bakterie > wolny enzym > immobilizowany enzym >

wolne drożdże, ale końcowe uzyski galaktooligosacharydów były, za wyjątkiem unieruchomionej podczyszczonej Pwβgal, bardzo zbliżone i wynosiły w przybliżeniu 150 mmol/dm³ (Rysunek 5.31.). Wydajności tGOS uzyskane za pomocą różnych form Pwβgal, pomimo że ze względu na trudności analityczne były jedynie wartościami szacunkowymi, sugerowały, że termofilna β-galaktozydaza z *P. woesei* była skuteczniejszym producentem galaktooligosacharydów niż laktulozy.

Produktywności osiągnięte przez badane biokatalizatory w ciągu początkowych 8 godzin reakcji porównano z wynikami uzyskanymi dla innych enzymów termofilnych (Tabela 5.12.). Oszacowane ilości tGOS produkowanych przez różne formy Pwβgal przeliczono na g/dm³ w oparciu o założenie, że średni stopień polimeryzacji uzyskanych produktów równy był 3 (podrozdział 1.2.1.), zatem masa molowa takiego „statystycznego” produktu wynosiła 504 g/mol. Parametrem, który najlepiej pozwala porównać efektywność różnych biokatalizatorów jest produktywność wyrażona w gramach produktu wytwarzanych przez jednostkę aktywności enzymu w jednostce czasu (tu g/U/godz). Na jego podstawie stwierdzono, że Pwβgal, bez względu na postać, była o wiele mniej skutecznym producentem tGOS, niż β-glukozydaza z *Thermus* sp. [Akiyama i wsp., 2001], ale znacznie lepszym od β-galaktozydazy z *Sulfolobus solfataricus* [Park i wsp., 2008]. Z kolei potencjał katalityczny komórek *E. coli* z Pwβgal unieruchomionych w alginianie wapnia oraz β-galaktozydazy z *Thermotoga maritima* [Ji i wsp., 2005] był porównywalny. Wydajności syntezy tGOS osiągane przy udziale rozmaitych enzymów bywają bardzo rozbieżne [Park i Oh, 2010]. Jak dotąd najlepsze rezultaty (produktywność na jednostkę objętości reaktora 106 g/dm³/godz) uzyskano podczas ciągłej syntezy tGOS prowadzonej przy udziale β-galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* unieruchomionej na tkaninie bawełnianej [Albayrak i Yang, 2002].

5.7. Zastosowanie różnych form Pwβgal do syntezy laktulozy i tGOS z serwatki

Tym, co czyniło Pwβgal wyjątkową na tle innych enzymów, była jej zdolność do wydajnego katalizowania transglikozylacji w obecności niskiego stężenia substratu (3% w/v laktoza; podrozdział 5.4.4.). Obserwacja powyższa nasunęła przypuszczenie, że Pwβgal mogłaby zostać wykorzystana do syntezy tGOS lub laktulozy bezpośrednio z laktozy zawartej w serwatce, przy czym uprzednie zateżnienie serwatki (np. poprzez ultrafiltrację) w celu zwiększenia w niej udziału laktozy nie byłoby konieczne. Przeprowadzono zatem serię reakcji, w których badane formy termofilnej β-galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* zastosowano do otrzymywania tGOS (Rysunek 5.32.A.) lub laktulozy (Rysunek 5.32.B.) z serwatki. Stężenie laktozy w serwatce użytej jako substrat wynosiło 43,6 oraz 39,1 g/dm³ (+ 39,8 g/dm³ fruktozy) podczas produkcji odpowiednio tGOS lub laktulozy (pozostałe parametry reakcji: 1,0 U/cm³; 80°C; 6 godz). W praktyce przemysłowej taka reakcja mogłaby być prowadzona równolegle z zateżnieniem serwatki metodą odparowania wody w niej zawartej.

Podobnie jak w trakcie reakcji prowadzonych przy wysokich stężeniach substratów, komórki *E. coli* z Pwβgal immobilizowane w alginianie wapnia produkowały najwięcej tGOS lub laktulozy. W środowisku serwatki przewaga unieruchomionych bakterii nad pozostałymi biokatalizatorami była jednak nieco mniej wyraźna (Rysunek 5.32.). Ilości laktulozy osiągane przy udziale badanych biokatalizatorów w serwatce z dodatkiem fruktozy były w przybliżeniu dwukrotnie niższe w porównaniu z ilościami uzyskiwanymi w obecności 10% laktozy i 10% fruktozy, natomiast ilości tGOS około 3 razy niższe niż w środowisku 15% laktozy (Tabela 5.13). Uzyski produktów malały zatem proporcjonalnie do spadku początkowego stężenia substratów w medium reakcyjnym. Również produktywności (wyrażone w g/dm³/godz oraz w g/U/godz) osiągane w tych warunkach były kilkakrotnie niższe niż w mieszaninach o wysokich zawartościach substratów. Z drugiej strony, względne wydajności procesu, odniesione do początkowego stężenia laktozy w mieszaninie reakcyjnej ($C_{\text{produktu}}/C_{\text{Lac}}$ w/w), wzrosły i wynosiły od 17,5% (Pwβgal unieruchomiona w alginianie wapnia) do 26,2% (komórki *E. coli* z Pwβgal unieruchomione w alginianie wapnia) w przypadku syntezy laktulozy, oraz od 38% (wolne komórki *P. pastoris* z Pwβgal) do 55% (komórki *E. coli* z Pwβgal unieruchomione w alginianie wapnia) podczas otrzymywania tGOS.

WNIOSKI I PERSPEKTYWY

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie przydatności rekombinantowej termofilnej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* do katalizowania syntezy oligosacharydów oraz opracowanie prostego i niedrogo sposobu immobilizacji tego enzymu, zapewniającego uzyskanie efektywnego i stabilnego biokatalizatora. Porównano zatem właściwości podczyszczonej Pw β gal z potencjałem katalitycznym czterech preparatów unieruchomionych: Pw β gal pułapkowanej w żelu alginianu wapnia, modyfikowanych genetycznie wolnych komórek bakterii *Escherichia coli* lub drożdży *Pichia pastoris* posiadających aktywność Pw β gal, oraz komórek *E. coli* z Pw β gal immobilizowanych w alginianie wapnia. Pozostawienie rekombinantowego enzymu w komórce gospodarza obniżało jego koszt oraz zapewniało najprostszy z możliwych sposobów unieruchomienia. W temperaturze powyżej 70°C, w której Pw β gal wykazywała wysoką aktywność, komórki mezofilnych drobnoustrojów ulegały inaktywacji i stanowiły jedynie mikrokapsułkę dla enzymu. Pułapkowanie w alginianie wapnia wybrano, ponieważ metoda ta umożliwia unieruchomienie w nierozpuszczalnym nośniku zarówno enzymu, jak i komórek, była nieskomplikowana i niedroga, a sam żel zachowywał stabilność w warunkach dogodnych dla Pw β gal.

Chemiczna permeabilizacja komórek bakterii lub drożdży okazała się zbyt cenna, gdyż pod wpływem podwyższonej temperatury ich błony cytoplazmatyczne (a w przypadku *E. coli* także błona zewnętrzna) ulegały częściowej destabilizacji i nie stanowiły istotnej bariery dyfuzyjnej dla substratów i produktów reakcji. Co więcej, podczas 30 minutowej inkubacji w 80°C aktywność β -galaktozydazy wykazywana przez komórki rosła o około 80%, prawdopodobnie na skutek zmian konformacyjnych rekombinantowego enzymu. Pw β gal mikrokapsułkowana w *E. coli* lub *P. pastoris* była bardziej stabilna podczas wydłużonej inkubacji w buforze octanowym (pH 5,4) w temperaturze 80 lub 90°C, niż enzym podczyszczony. Szybciej jednak traciła aktywność, gdy w środowisku reakcji obecne były cukry redukujące, co prawdopodobnie było rezultatem inaktywacji enzymu produktami reakcji Maillarda.

Rekombinantowa β -galaktozydaza z *P. woesei* wykazywała znaczną aktywność transglikozylacyjną. W warunkach eksperymentu nie zaobserwowano natomiast zdolności enzymu do katalizowania odwrotnej hydrolizy. Jako model do badania potencjału transglikozylacyjnego wolnej i immobilizowanej Pw β gal przyjęto otrzymywanie laktulozy z laktozy i fruktozy. Reakcji tej towarzyszyła enzymatyczna hydroliza laktozy oraz synteza *trans*-galaktooligosacharydów. Synteza laktulozy katalizowana przez badane biokatalizatory przebiegała najbardziej wydajnie w temperaturze 80°C i pH 5,4, w obecności 10% w/v laktozy i 10% w/v fruktozy. Spośród wszystkich analizowanych preparatów β -galaktozydazy, najbardziej efektywnym okazały się komórki *E. coli* z Pw β gal pułapkowane w alginianie wapnia, które we wspomnianych warunkach w ciągu 8 godzin produkowały 18,2 g/dm³

laktulozy. Skuteczność wolnych komórek *E. coli* z Pw β gal była bardzo zbliżona. Niedostateczna stabilność żelu alginianowego ograniczała jednak, w porównaniu z wolnymi komórkami, ilość oddzielnych cykli syntezy laktulozy katalizowanych za pomocą immobilizowanego biokatalizatora. Znaczącej poprawy trwałości granul nie przyniosło zwiększenie procentowości żelu, dodatek żelu krzemionkowego, tlenku glinu, chitozanu, ani pokrycie otoczką chitozanową. Pomimo kruchości, granule zachowywały stabilność, gdy stosowane były jako wypełnienie reaktora kolumnowego, w którym prowadzono syntezę laktulozy metodą okresową z zupełną recyrkulacją substratu przez złożę. Układ ten nie polepszył jednak wydajności przemiany. Nieco wyższe, ale wciąż niesatysfakcjonujące, produktywności dało użycie bakterii z Pw β gal immobilizowanych w alginianie wapnia jako złoża fluidalnego w reaktorze barbotażowym. System ten wymusił dodatkowo obniżenie temperatury reakcji do 60°C, ponieważ w wyższych temperaturach granule biokatalizatora ulegały uszkodzeniu przy wydłużonym czasie reakcji. Inną niedogodnością wynikającą ze stosowania biokatalizatorów pułapkowanych w alginianie wapnia było rozcieńczanie mieszaniny reakcyjnej przez wodę zamkniętą w porach żelu, co obniżało wydajność syntezy i uniemożliwiało zwiększenie zawartości biokatalizatora w medium reakcyjnym. Obserwacje te nasunęły wniosek, że najbardziej dogodną i uniwersalną, a zarazem najmniej kosztowną formą Pw β gal były nieaktywne komórki *E. coli* lub *P. pastoris* stanowiące mikrokapsułkę dla termofilnego enzymu. Rezultaty przeprowadzonych badań sugerowały ponadto, że potencjał katalityczny rekombinantowych termofilnych enzymów mikrokapsułkowanych w nieaktywnych komórkach mezofilnego gospodarza mógłby zostać wykorzystany także w innych, niż synteza oligosacharydów, procesach biotechnologicznych przebiegających w podwyższonej temperaturze w środowisku wodnym (przy wysokiej zawartości rozpuszczalników organicznych w medium reakcyjnym następuje solubilizacja komórek).

Rekombinowane komórki *E. coli* wykazywały prawie 5-krotnie wyższą aktywność β -galaktozydazy w reakcjach z oNP β Gal niż drożdże *P. pastoris*. Efektywniej też katalizowały syntezę laktulozy lub tGOS. Stosowanie komórek *E. coli* do produkcji dodatków do żywności rodzi jednak obawy odnośnie bezpieczeństwa zdrowotnego wytwarzanych substancji. Obawy wynikają głównie z możliwości zanieczyszczenia produktu bakteriami lub składnikami ich komórek. W przypadku *E. coli* BL21(DE3) z Pw β gal ryzyko jest niewielkie, ponieważ bakterie te są niepatogenne, a w warunkach proponowanego procesu ulegają szybkiej termicznej inaktywacji i uwalniają do środowiska jedynie znikome ilości białka. Ponadto, po reakcji muszą zostać usunięte z mieszaniny, na przykład poprzez wirowanie. Produkt natomiast może zostać dodatkowo poddany procedurze UHT.

Kontrowersje wokół drożdży *Pichia pastoris* są mniejsze, ponieważ, w przeciwieństwie do szczepów *E. coli*, posiadają one rekomendację EFSA jako gatunek bezpieczny do produkcji rekombinantowych enzymów stosowanych w żywności [European Food Safety Authority, 2008;

Leuchner i wsp., 2010]. Niewykluczone, że w przyszłości zostaną zaakceptowane także jako dodatek do żywności i/lub paszy dla zwierząt.

W kontekście przemysłowej katalizy, Pw β gal mikroksułowana w komórkach *P. pastoris* jest bardzo interesującym enzymem. Jej ogromnymi zaletami są: niski koszt wyprodukowania, który nie powinien przekraczać kosztu przygotowania drożdży piekarskich, łatwość oddzielenia od mieszaniny poreakcyjnej (wirowanie lub filtracja próżniowa), oraz pełna biodegradowalność zużytego biokatalizatora. Natomiast poprawę aktywności katalitycznej rekombinowanych drożdży mogłoby przynieść skonstruowanie indukowanego systemu ekspresji genu termofilnej β -galaktozydazy [Cereghino i Cregg, 2000; Gellissen, 2000; Sudbery, 1996]. Szczep tego typu, w ramach realizacji własnej pracy doktorskiej, przygotowała Wanarska [2005]. Ponieważ induktorem wykorzystywanym podczas jego hodowli był metanol, używanie takich drożdży w procesie produkcji dodatków do żywności stwarzałoby zagrożenie polegające na możliwości zanieczyszczenia produktu finalnego alkoholem metylowym. Innym rozwiązaniem mogłoby być wprowadzenie metodami inżynierii genetycznej do struktury samej Pw β gal modyfikacji, mających na celu spotęgowanie aktywności transglikozylacyjnej enzymu, przy jednoczesnym zahamowaniu jego aktywności hydrolitycznej.

Produktem końcowym reakcji transglikozylacji katalizowanej przez rekombinantową β -galaktozydazę z *Pyrococcus woesei* jest mieszanina sacharydów, zawierająca pozostałości substratów (laktozy lub laktozy i fruktozy), oligosacharydy, glukozę i galaktozę. W celu wyodrębnienia laktulozy lub tGOS z medium po reakcji konieczne jest zatem zastosowanie rozdzielania chromatograficznego na złożach jonowymiennych [Carobbi i wsp., 1985; Deya i wsp., 1990; Filippini i Carobbi, 1986]. Interesującą alternatywą dla tego rozwiązania mogłoby być usunięcie z mieszaniny poreakcyjnej laktozy w wyniku jej utlenienia do kwasu laktobionowego za pomocą dehydrogenaz celobiozowych [Maischberger i wsp., 2008; Splechna i wsp., 2001] lub usunięcie laktozy i monosacharydów na drodze fermentacji prowadzonej przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces lactis* [Li i wsp., 2008]. Z drugiej strony, należy pamiętać, że wszystkie sacharydy obecne w mieszaninie poreakcyjnej są jadalne i nieszkodliwe (pozostałość laktozy jest niewielka, więc nie powinna powodować objawów nietolerancji u osób nietrawiących cukru mlecznego), dlatego syrop ten, bez rozdzielania na poszczególne składniki, mógłby znaleźć zastosowanie jednocześnie jako środek słodzący i substancja o oddziaływaniu prebiotycznym.

Rekombinantowa termostabilna β -galaktozydaza z *Pyrococcus woesei*, szczególnie w postaci enzymu mikroksułowanego w nieaktywnych komórkach modyfikowanych genetycznie drożdży *Pichia pastoris*, ze względu na stosunkowo dobre właściwości katalityczne oraz bardzo niski koszt wytworzenia może stanowić atrakcyjny biokatalizator w przemysłowej syntezie laktulozy i/lub tGOS.

WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Publikacje w czasopismach naukowych

Synowiecki J., Sinkiewicz I., **Grubiak K.**, Pietrow O., Zakrzewska A. (2011): β -galactosidase activity of *Meiothermus ruber* cells. *Journal of Food Biochemistry* (tekst przyjęty do druku)

Panek A., **Grubiak K.**, Synowiecki J. (2010): Hydrolytic and transgalactosylation activities of immobilized *Escherichia coli* cells transformed with β -galactosidase gene from *Pyrococcus woesei*. *Acta Biochimica Polonica*, 57, Suppl. 3, 34

Grubiak K., Synowiecki J. (2009): Wytwarzanie glukozylofruktozy przez transglikozylację katalizowaną komórkami *E. coli* transformowanymi genem termostabilnej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei*. *Biotechnologia*, 1(84): 152-162

Konferencje naukowe

Panek A., **Grubiak K.**, Synowiecki J. Hydrolytic and transgalactosylation activities of immobilized *Escherichia coli* cells transformed with β -galactosidase gene from *Pyrococcus woesei*. Eurobiotech 2010, 20 – 22.09.2010, Kraków

Grubiak K., Synowiecki J. Aktywność transglikozylacyjna rekombinantowej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei*. XXXIX Sesja Komitetu Nauk o Żywności PAN „Postęp w wytwarzaniu i ocenie żywności” 29.06 – 01.07.2009, Poznań

Grubiak K., Synowiecki J. Właściwości rekombinantowych komórek *E. coli* posiadających aktywność termo stabilnej β -galaktozydazy. XIV Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Jakość i bezpieczeństwo żywności- wyzwanie XXI wieku” 21 – 22.05.2009, Gdynia

Grubiak K., Sinkiewicz I., Synowiecki J. Lactulose synthesis catalysed by immobilized recombinant *E. coli* cells with β -galactosidase activity. 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting 10 – 13.05.2009, Ischia, Włochy

Skrypt akademicki

Synowiecki J., Filipkowski P., **Grubiak K.**, Sinkiewicz I., Szweda P. „Technologia preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego. Materiały pomocnicze i ćwiczenia laboratoryjne”. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2007

Granty i stypendia

Grant badawczy (promotorski) Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt.: „Ocena przydatności rekombinantowej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* do otrzymywania wybranych sacharydów o właściwościach prebiotycznych” (04.02.2010 – 30.06.2011)

Stypendium w ramach projektu „InnoDoktorant– stypendia dla doktorantów, II edycja”, przyznane przez Zarząd Województwa Pomorskiego (01.12.2009 – 31.08.2010)

Warsztaty naukowe i szkolenia

Summer School Glycosciences- 11th European Training Course on Carbohydrates, Wageningen, Holandia (17 - 20.05.2010)

Audytor Wewnętrzny Systemu HACCP; prowadzący: dr inż. Robert Tylingo, Politechnika Gdańska (30.06 – 01.07.2007)

LITERATURA

- Adamczak M., Charubin D., Bednarski W. (2009): Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chemical Papers*, 2, 63, 111-116
- Adlercreutz P. (2006): Immobilization of enzymes for use in organic media. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. Second edition. (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 251-256
- Aider M., de Halleux D. (2007): Isomerization of lactose and lactulose production: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 356-364
- Ajisaka K.; Fujimoto H.; Nishida H.(1988): Enzymic synthesis of disaccharides by use of the reversed hydrolysis activity of β -D-galactosidases. *Carbohydrate Research*, 180, 35-42
- Akita H., Kurashima K., Nakamura T., Kato K. (1999). Chemoenzymatic synthesis of naturally occurring β -glucosides. *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 2429 – 2439
- Akiyama K., Takase M., Horikoshi K., Okonogi S. (2001): Production of galactooligosaccharides from lactose using a β -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2, 65, 438-441
- Alakomi H-L.; Skyttä E.; Saarela M.; Mattila-Sandholm T.; Latva-Kala K.; Helander I.M. (2000): Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 2001-2005
- Albayrak N., Yang S.-T. (2002). Production of galactooligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 8 – 19
- Alvarez G.S.; Desimone M.F.; Diaz L.E. (2007): Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol-gel process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1059-1064
- American Dietetic Association (2009): Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 4, 109, 735-746
- Anal A.K., Singh H. (2007): Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240-251
- Ariga O.; Toyofuku H.; Matsudaira K.; Sano Y.; Kuroiwa I. (1995): Effect of incubation conditions on the release of recombinant product in immobilized *Escherichia coli* cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 616-618
- Aslan Y., Tanriseven A. (2007): Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45, 73–77
- Bäckhead F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. (2005): Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-1920
- Bansal-Mutalik R.; Gaikar V.G. (2003): Cell permeabilization for extraction of penicillin acylase from *Escherichia coli* by reverse micellar solutions. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 14-26
- Bartolozzi A., Seeberger P. (2001). New approaches to the chemical synthesis of bioactive oligosaccharides. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 587 - 592
- Batista-Viera F., Ovsejevi K., Manta C. (2006): Reversible covalent immobilization of enzymes via their thiol groups. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. Second edition. (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 185-204
- Becerra M., Baroli B., Fadda A.M., Blanco Méndez J., González Siso M.I. (2001): Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 506-512
- Bech-Larsen T., Scholderer J. (2007): Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 231-234
- Bednarski W., Kulikowska A. (2007): Wpływ warunków reakcji na wydajność enzymatycznej syntezy galactooligosacharydów przez β -galaktozydazę z *Penicillium canescens*. *Biotechnologia*, 2, 77, 137-148

- Bickerstaff G. (1997): Immobilization of enzymes and cells. Some practical considerations. W: *Methods in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. (Praca zbiorowa pod redakcją G. Bickerstaff) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 1-11
- Blanchard S., Thorson J.S. (2006): Enzymatic tools for engineering natural product glycosylation. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 263-271
- Bonnin E., Lahaye M., Vigouroux J., Thibault J.-F. (1995). Preliminary characterization of a new exo- β -(1,4)-galactanase with transferase activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 17, 345 – 351
- Bonnin E., Thibault J.-F. (1996). Galactooligosaccharide production by transfer reaction of an exogalactanase. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 99 – 106
- Boraston A.B., Bolam D.N., Gilbert H.J., Davies G.J. (2004): Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemistry Journal*, 382, 769-781
- Borchers A.T., Selmi C., Meyers F.J., Keen C.L., Gershwin M.E. (2009): Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44, 26-46
- Boyle R.J., Robins-Browne R.M., Tang M.J.K. (2006): Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *American Journal of Clinical Nutrition* 83, 1256-1264
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brena B.M., Batista-Viera F. (2006): Immobilization of enzymes: a literature survey. W: *Methods in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. Second edition. (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 15-30
- Bruins M.E., Janssen A.E.M., Boom R.M. (2001): Thermozyzymes and their applications. A review of recent literature and patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90, 155-186
- Bruins M.E., Thewessen A.J.H., Janssen A.E.M., Boom R.M. (2003b): Enzyme inactivation due to Maillard reactions during oligosaccharide synthesis by a hyperthermophilic glycosidase: influence of enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, 31-34
- Bruins M.E., Van Hellemond E.W., Janssen A.E.M., Boom R.M. (2003a): Maillard reactions and increased enzyme inactivation during oligosaccharide synthesis by a hyperthermophilic glycosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 5, 81, 546-552
- Buchowiecka A., Bielecki S. (2000a): Postępy w enzymatycznej syntezie oligosacharydów katalizowanej przez endoglikozydazy. *Biotechnologia*, 2, 49, 174-183
- Buchowiecka A., Bielecki S. (2000b): Enzymatyczna synteza oligosacharydów przez egzoglikozydazy. *Biotechnologia*, 3, 50, 164-180
- Bucke C. (1996): Oligosaccharide synthesis using glycosidases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 67, 217 – 220
- Campàs M., Marty J.-L. (2006): Encapsulation of enzymes using polymers and sol-gel techniques. W: *Methods in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 77-85
- Cánovas M.; Torroglosa T.; Iborra J.L. (2005): Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 300-308
- Cantacuzene D., Attal S. (1991). Enzymic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using galactosidases. *Carbohydrate Research*, 211, 327 – 331
- Cardelle-Cobas A., Martínez-Villaluenga C., Villamiel M., Olano A., Corzo N. (2008): Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 3328–3333
- Cargelle-Cobas A., Martínez-Villaluenga C., Sanz M.L., Montilla A. (2009): Gas chromatographic- mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives obtained by the action of two different β -galactosidases. *Food Chemistry*, 114, 1099-1105
- Carobbi R., Miletti S., Franci V. (1985): Process for purification lactulose syrup. US Patent 4555271

- Cereghino J.L., Cregg J.M. (2000): Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45–66
- Chang T.M.S. (2005): Methods for bioencapsulation of enzymes and cells. W: *Methods in Biotechnology: Microbial enzymes and biotransformations*. (Praca zbiorowa pod redakcją J.L. Barredo) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 289-306
- Chao Y-P.; Fu H.; Lo T-E.; Chen P.T.; Wang J-J. (1999): One-step production of D-p-hydroxyphenylglycine by recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnology Progress*, 15, 1039-1045
- Chen S.-X., Wei D.-Z., Hu Z.-H. (2001). Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micells by β -galactosidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16, 109–114
- Chien C-S.; lee W-C.; Lin T-J. (2001): Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 252-257
- Chitradon L., Mahakhan P., Bucke C. (2000). Oligosaccharide synthesis by reversed catalysis using α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 273 – 280
- Cho M-H., Park S-E., Lim J.K., Kim J-S., Kim J.H., Kwon D.Y., Park C-S. (2007): Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. *Biotechnology Letters*, 29, 453-458
- Chockchaisawasdee S., Athanasopoulos V.I., Niranjana K., Rastall R.A. (2005). Synthesis of galactooligosaccharides from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 434 – 443
- Collins M.D., Gibson G.R. (1999): Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (Suppl), 1052S-1057S
- Coppa G.V., Bruni S., Morelli L., Soldi S., Gabrielli O. (2004): The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38 (6 Suppl), S80-S83
- Craven G.R., Steers E., Anfinsen C.B. (1965): Purification, composition and molecular weight of the β -galactosidase of *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry*, 240, 2468-2477
- Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. (2000): Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16, 23-52
- Crittenden R.G., Playne M.J. (1996): Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 353 – 361
- Crout D.H.G., Vic G. (1998): Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 98–111
- Cruz A.G., Antunes A.E.C., Sousa A.L.O.P., Faria J.A.F., Saad S.M.I. (2009): Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 9, 42, 1233-1239
- Cruz-Guerrero A.E., Gómez-Ruiz L., Viniegra-González G., Bárzana E., Garcia-Garibay M. (2006). Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic β -glycosidase in an organic medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 1123–1129
- Cumming R.H., Icton G. (2001): Cell disintegration and extraction techniques. W: *Protein purification techniques: a practical approach. Second edition*. (Praca zbiorowa pod redakcją S.D. Roe) Oxford University Press Inc., Nowy Jork, str. 83-109
- Dąbrowski S., Maciuńska J., Synowiecki J. (1998). Cloning and nucleotide sequence of the thermostable β -galactosidase gene from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. *Molecular Biotechnology*, 10, 217 - 222
- Dąbrowski S., Sobiewska G., Maciuńska J., Synowiecki J., Kur J. (2000): Cloning, expression, and purification of the His₆-tagged thermostable β -galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. *Protein Expression and Purification*, 19, 107-112
- Daines A.M., Maltman B.A., Flitsch S.L. (2004): Synthesis and modifications of carbohydrates using biotransformations. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 106-113

- Das-Bradoo S.; Svensson I.; Santos J.; Plieva F.; Mattiasson B.; Hatti-Kaul R. (2004): Synthesis of alkylgalactosides using whole cells of *Bacillus pseudofirmus* species as catalysts. *Journal of Biotechnology*, 110, 273-285
- Daunert S., Bachas L.G., Schauer-Vukasinovic V., Gregory K.J., Schriff G., Deo S. (2007): Calmodulin-mediated reversible immobilization of enzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58, 20–27
- de Ory I., Cabrera G., Ramirez M., Blandino A. (2006): Immobilization of cells on polyurethane foam. W: *Methods in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 357-365
- Desimone M.F.; De Marzi M.C.; Copello G.J.; Fernández M.M.; Pieckenstain F.L.; Malchiodi E.L.; Diaz L.E. (2006): Production of recombinant proteins by sol-gel immobilized *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 168-171
- Deya E., Takahashi K., Ikeuchi Y. (1990): Production process of high-purity lactulose syrup. EP 0357068A2
- Di Lernia I.; Schiraldi C.; Generoso M.; De Rosa M. (2002): Trehalose production at high temperature exploiting an immobilized cell bioreactor. *Extremophiles*, 6, 341-347
- Dobrevá E.; Tonkova A.; Ivanova V.; Stefanova M.; Kabaivanova L.; Spasova D. (1998): Immobilization of *Bacillus licheniformis* cells, producers of thermostable α -amylase, on polymer membranes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 166-170
- Doig S.D.; Simpson H.; Alphand V.; Furstoss R.; Woodley J.M. (2003): Characterization of a recombinant *Escherichia coli* TOP10 [pQR239] whole-cell biocatalyst for stereoselective Baeyer-Villiger oxidations. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 347-355
- Doleyres Y.; Fliss I.; Lacroix C. (2004): Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. *Biotechnology Progress*, 20, 145-150
- Doronina N.V.; Nazarov N.M.; Ezhov V.A.; Trotsenko Yu.A. (2006): Biodegradation of methyl and ethyl acetates by immobilized *Pseudomonas esterophilus* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 45-47
- Doukyu N., Ogino H. (2010): Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 270-282
- Dräger G., Kiss C., Kunz U., Kirschning A. (2007): Enzyme-purification and catalytic transformations in a microstructured PASSflow reactor using a new tyrosine-based Ni-NTA linker system attached to a polyvinylpyrrolidone-based matrix. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 5, 3657–3664.
- Eichler J. (2001). Biotechnological uses of archeal extremozymes. *Biotechnology Advances*, 19, 261 - 278
- Eiwegger T., Stahl B., Haidl P., Schmitt J., Boehm G., Dehlink E., Urbanek R., Szépfalusi Z. (2010): Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric Allergy and Immunology*, DOI: 10.1111/j.1399-3038.2010.01062.x
- Euromonitor International (2006): Functional products meet the demands of today's consumer. www.euromonitor.com
- European Food Safety Authority (2008): The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal*, 923, 1-48
- Fajjes M., Planas A. (2007): In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. *Carbohydrate Research*, 342, 1581–1594
- Falkoski D.L., Guimarães V.M., de Queiroz M.V., de Araújo E.F., de Almeida M.N., de Barros E.G., de Rezende S.T. (2009): Covalent immobilization of α -galactosidase from *Penicillium griseoroseum* and its application in oligosaccharides hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158, 540–551
- Fanaro S., Boehm G., Garssen J., Knol J., Mosca F., Stahl B., Vigi V. (2005): Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: a review. *Acta Paediatrica*, 94 (Suppl 449), 22-26
- FAO/WHO (2002): Guidelines for the evaluation of probiotics in food. www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/
- Filippini A., Carobbi R. (1986): Lactulose purification process. US Patent 4565582
- Fooks L.J., Fuller R., Gibson G.R. (1999): Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal* 9, 53-61

- Franck A. (2008): Food applications of prebiotics. W: *Handbook of prebiotics*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i M.B. Roberfroid), Taylor & Francis Group LLC, USA, str. 437-448
- Fraser J.E., Bickerstaff G.F. (1997): Entrapment in calcium alginate. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. (Praca zbiorowa pod redakcją G. Bickerstaff) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 61-66
- Fujita Y.; Katahira S.; Ueda M.; Tanaka A.; Okada H.; Morikawa Y.; Fukuda H.; Kondo A. Construction of whole-cell biocatalyst for xylan degradation through cell-surface xylanase display in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17, 189-195
- Fukano Y.; Ito M. (1997): Preparation of GM1 ganglioside with sialidase-producing marine bacteria as a microbial biocatalyst. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1861-1865
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. (2010): Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15-S28
- Gellissen G. (2000): Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 741-750
- Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995): Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412
- Giordano A., Andreotti G., Tramice A., Trincone A. (2006). Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. *Biotechnology Journal*, 1, 511-530
- Girigowda K., Mulimani V.H. (2006): Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by κ -carrageenan-entrapped α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 437-442
- Gòdia F. Solà C. (1995): Fluidized-bed bioreactors. *Biotechnology Progress*, 11, 479-497
- Gombotz W.R., Fong Wee S. (1998): Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 267-285
- Gough S.; Dostal L.; Howe M.; Deshpande M.; Scher M.; Rosazza J.N.P. (2005): Production of pyruvate from lactate using recombinant *Pichia pastoris* as catalyst. *Process Biochemistry*, 40, 2597-2601
- Groboillot A.; Boadi D.K.; Poncelet D., Neufeld R.J. (1994): Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 75-107
- Guisan J.M. (2006): Immobilization of enzymes as the 21st century begins. An already solved problem or still an exciting challenge? W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 1-14
- Haider T., Husain Q. (2007): Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 72-80
- Hansson T., Adlercreutz P. (2001): Enhanced transglucosylation/hydrolysis ratio of mutants of *Pyrococcus furiosus* β -glucosidase: effects of donor concentration, water content, and temperature on activity and selectivity in heksanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 75, 656 - 665
- Hasal P.; Vojtišek V.; Čejková A.; Kleczek P.; Kofroňová O. (1992): An immobilized whole yeast cell biocatalyst for enzymatic sucrose hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 221-229
- Helander I.M., Mattila-Sandholm T. (2000): Fluoretretric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 213-219
- Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E-L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roler S. (2001): Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 235-244
- Hemachander C.; Bose N.; Puvanakrishnan R. (2001): Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochemistry*, 36, 629-633
- Honda Y., Kitaoka M. (2006): The first glycosynthase derived from inverting glycoside hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 3, 281, 1426-1431

- Hong Y-H.; Lee D-W.; Lee S-J.; Choe E-A.; Kim S-B.; Lee Y-H.; Cheigh C-I.; Pyun Y-R. (2007): Production of D-tagatose at high temperatures using immobilized *Escherichia coli* cells expressing L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology Letters*, 29, 569-574
- Hough D.W., Danson M.J. (1999): Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 39–46
- Hsu C.A., Lee S.L., Chou C.C. (2007): Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 2225-2230
- Hult K., Berglund P. (2003): Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 395-400
- Iborra J.L., Manjón A., Cánovas M. (1997): Immobilization in carrageenans. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. (Praca zbiorowa pod redakcją G. Bickerstaff) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 53-60
- Ikura Y. (1986): Effect of glycine and its derivatives on production and release of β -galactosidase by *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 2747-2753
- Ishibashi N., Yamazaki S. (2001): Probiotics nad safety. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (Suppl), 465S-470S
- Ji E-S., Park N-H., Oh D-K. (2005): Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritime*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 759–764
- Jose J.; von Schwichow S. (2004): Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *ChemBioChem*, 5, 491-499
- Jung E-S.; Kim H-J.; Oh D-K. (2005): Tagatose production by immobilized recombinant *Escherichia coli* cells containing *Geobacillus stearothermophilus* l-arabinose isomerase mutant in packed-bed bioreactor. *Biotechnology Progress*, 21, 1335-1340
- Kamrat T.; Nidetzky B. (2007): Entrapment in *E. coli* improves the operational stability of recombinant β -glycosidase CelB from *Pyrococcus furiosus* and facilitates biocatalyst recovery. *Journal of Biotechnology*, 129, 69-76
- Kim Y-S., Park C-S.; Oh D-K. (2006): Lactulose production from lactose and fructose by thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 903-908
- Kittl R., Withers S.G. (2010): New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydrate Research*, 345, 1272-1279
- Klewicki R. (2010): Synteza, budowa i właściwości β -galaktozylopolihydroksyalkoholi otrzymanych w reakcji transglikozylacji z udziałem β -galaktozydazy. Rozprawa habilitacyjna. Politechnika Łódzka
- Klibanov A.M. (1983): Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*, 219, 722-727
- Koeller K.M., Wong C.-H. (2000): Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: enzyme-based and programmable one-pot strategies. *Chemical Reviews*, 100, 4465 – 4493
- Kolida S., Gibson G.R. (2008): The prebiotic effect: review of experimental and human data. W: *Handbook of Prebiotics*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i M.B. Roberfroid), Taylor & Francis Group, LLC, str. 69-92
- Kolot F.B. (1981a): Microbial carriers- strategy for selection. Part 1. *Process Biochemistry*, Aug/Sept, 3-9
- Kolot F.B. (1981b): Microbial carriers- strategy for selection. Part 2. *Process Biochemistry*, Oct/Nov, 30-33, 46
- Kone F.M., Osanjo G., Tran V., Rabiller C., Dion M., Tellier C. (2009): Converting glycosidases into transglycosidases by directed evolution. 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Ischia, Neapol, Włochy
- Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. (2006): Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 41, 343-349
- Krajewska-Kamińska E., Śmietana Z., Bohdziewicz K. (2007): Bakterie probiotyczne w produkcji żywności. *Przemysł Spożywczy*, 5, 36-41
- Krastanov A. (1997): Continuous sucrose hydrolysis by yeast cells immobilized to wool. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 476-481

- Krastanov A.; Blazheva D.; Yanakieva I.; Kratchanova M. (2006): Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous process by immobilized *Serratia plymuthica* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1306-1312
- Kylä-Nikkilä K., Alakujala U., Saris P.E.J. (2010): Immobilization of *Lactococcus lactis* to cellulosic material by cellulose-binding domain of *Cellvibrio japonicas*. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1274–1283
- Larsson J., Svensson D., Adlercreutz P. (2005): α -Amylase-catalysed synthesis of alkyl glikosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 37, 84–87
- Lee S-O.; Hong G-W.; Oh D-K. (2003): Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid by immobilized *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Progress*, 19, 1081-1084
- Lee Y-J., Kim C.S., Oh D-K. (2004): Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 787 – 793
- Lehtiö J., Wernérus H., Samuelson P., Teeri T.T., Ståhl S. (2001): Directed immobilization of recombinant staphylococci on cotton fibers by functional display of a fungal cellulose-binding domain. *FEMS Microbiology Letters*, 195, 197-204
- Lenoir-Wijnkoop I., Sanders M.E., Cabana M.D., Caglar E., Corthier G., Rayes N., Sherman P.M., Timmerman H.M., Vaneechoutte M., Van Loo J., Wolvers D.A.W. (2007): Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutrition Reviews*, 11, 65, 469-489
- Leuschner R.G.K., Robinson T.P., Hugas M., Cocconcell P.S., Richard-Forget F., Klein G., Licht T.R., Nguyen-The C., Querol A., Richardson M., Suarez J.E., Thrane U., Vlaskovic J.M., von Wright A. (2010): Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science and Technology*, 21, 425-435
- Li J., Wang P.G. (1997). Chemical and enzymatic synthesis of glycoconjugates 2. High yielding regioselective synthesis of N-acetyllactosamine by use of recombinant thermophilic glycosidases library. *Tetrahedron Letters*, 38, 7967 – 7970
- Li Z., Xiao M., Lu L., Li Y. (2008): Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. *Process Biochemistry*, 43, 896–899
- Liong M.-T. (2008): Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutrition Reviews*, 4, 66, 192-202
- López-Leiva M.H., Guzman M. (1995). Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochemistry*, 30, 757 - 762
- Lovegrove J.A., Jackson K.G. (2000): Coronary heart disease. W: *Functional Foods. Concept to Product*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i C.M. Williams). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Anglia, 97-139
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256 - 275
- Luzhetskyy A., Bechthold A. (2008): Features and applications of bacterial glycosyltransferases: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 945-952
- Luzhetskyy A., Méndez C., Salas J.A., Bechthold A. (2008): Glycosyltransferases, important tools for drug design. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8, 8, 680-709
- Macfarlane S., Macfarlane G.T. (2004): Bacterial diversity in the human gut. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 261-289
- Maciuńska J. (1999): Otrzymywanie i właściwości termostabilnych β -D-galaktozydaz wytwarzanych przez *Thermus thermophilus* i zmodyfikowaną genetycznie *Escherichia coli*. Rozprawa doktorska. Politechnika Gdańska
- Mackenzie L.F., Wang Q., Warren R.A.J., Withers S.G. (1998): Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *Journal of American Chemical Society*, 120, 5583-5584
- Mahoney R.R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63, 147 - 154
- Maischberger T., Nguyen T-H., Sukyai P., Kittl R., Riva S., Ludwiga R., Haltrich D. (2008): Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. *Carbohydrate Research*, 343, 2140–21

- Mäkeläinen H., Hasselwander O., Rautonen N., Ouwehand A.C. (2009): Panose, a new prebiotic candidate. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 666-672
- Mammarella E.J., Rubiolo A.C. (2009): Effect of biocatalyst swelling on the operation of packed-bed immobilized enzyme bioreactor. *Process Biochemistry*, 44, 183–190
- Manolov R.J.; Kambourova M.S.; Emanuilova E.I. (1995): Immobilization of *Bacillus stearothermophilus* cells by entrapment in various matrices. *Process Biochemistry*, 30, 141-144
- Martins S.I.F.S., Jongen W.M.F., van Boekel M.A.J.S. (2001): A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 364-373
- Mateo C., Abian O., Fernández-Lorente G., Pessela B.C.C., Grazu V., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. (2006 a): Immobilization–stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment on supports activated with epoxy groups. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 47-55
- Mateo C., Pessela B.C.C., Fuentes M., Torres R., Betancor L., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. (2006 b): Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde–dextran. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition*. (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 129-141
- Mateo C., Pessela B.C.C., Fuentes M., Torres R., Ortiz C., López-Gallego F., Betancor L., Alonso-Morales N., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. (2006 c): Very strong but reversible immobilization of enzymes on supports coated with ionic polymers. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 205-216
- Mathur S., Singh R. (2005): Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295
- 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 Wrigh A. (1999): Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 393-399
- Mayer J.; Conrad J.; Klaiber I.; Lutz-Wahl S.; Beifuss U.; Fischer L. (2004): Enzymatic production and complete nuclear magnetic resonance assignment of the sugar lactulose. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6983-6990
- Melo J.S.; D'Souza S.F. (1999): Simultaneous filtration and immobilization of cells from a flowing suspension using a bioreactor containing polyethylenimine coated cotton threads: application in the continuous inversion of concentrated sucrose syrups. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 17-21
- Melzoch K.; Votruba J.; Hábová V.; Rychtera M. (1997): Lactic acid production in cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate. *Journal of Biotechnology*, 56, 25-31
- Menrad K. (2003): Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56, 181-188
- Monsan P., Remaud-Siméon M., André I. (2010): Transglucosidases as efficient tools for oligosaccharide and glycoconjugate synthesis. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 1-8
- Montilla A., del Castillo M.D., Sanz M.L., Olano A. (2005): Egg shell as catalyst of lactose isomerisation to lactulose. *Food Chemistry*, 90, 883 – 890
- Moracci M., Trincone A., Cobucci-Ponzano B., Perugino G., Ciaramella M., Rossi M. (2001a): Enzymatic synthesis of oligosaccharides by two glycosyl hydrolases of *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, 5, 145 - 152
- Moracci M., Trincone A., Rossi M. (2001b): Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 155 – 163
- Mottet C., Michetti P. (2005): Probiotics: wanted dead or alive. *Digestive and Liver Disease* 37, 3-6
- Murata T., Usui T. (2006): Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 5, 70, 1049-1059
- Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., Knight S.C. (2009): Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases* 2, 15, 300-310

- Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., Antranikian G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 711 – 729
- Nigam J.N. (2000): Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 80, 189-193
- Norouzian D.; Javadpour S.; Moazami N.; Akbarzadeh A. (2002): Immobilization of whole cell penicillin G acylase in open pore gelatin matrix. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 26-29
- Novick S.J., Rozzell J.D. (2005): Immobilization of enzymes by covalent attachment. W: *Methods in Biotechnology: Microbial enzymes and biotransformations*. (Praca zbiorowa pod redakcją J.L. Barredo) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 247-271
- Olano A., Corzo N. (2009): Lactulose as a food ingredient. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 89, 1987-1990
- Olesienkiewicz A., Grajek W. (2005): Enzymatyczna synteza oligosacharydów. W: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. (Praca zbiorowa pod redakcją E. Kołakowskiego, W. Bednarskiego i S. Bieleckiego), WAR, Szczecin, str. 429-449
- Oluoch K.R.; Welander U.; Andersson M.M.; Mula F.J.; Mattiasson B.; Hatti-Kaul R. (2006): Hydrogen peroxide degradation by immobilized cells of alkaliphilic *Bacillus halodurans*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24, 215-222
- Orive G., Hernández R.M., Gascón A.R., Pedraz J.L. (2006): Encapsulation of cells in alginate gels. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 345-355
- Oscarson S. (2009): The chemist's way to synthesize glycosides. W: *The Sugar Code: fundamentals of glycosciences*. (Praca zbiorowa pod redakcją H.-J. Gabius), Wiley-VCH, Weinheim, Niemcy, str. 31-51
- Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. (2002): Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 279–289
- Pal S., Nair V. (1997): Biocatalytic synthesis of base-modified 2'-deoxy- β -D-ribonukleosides with bacterial whole cells. *Biotechnology Letters*, 4, 19, 349-351
- Palcic M.M. (1999): Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 616–624
- Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Segura R.L., Ortiz C., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. (2006): Purification, immobilization, hyperactivation, and stabilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 143-152
- Park A-R., Oh D-K. (2010): Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1279-1286
- Park H-J., Kim H-J., Lee J-K., Kim D., Oh D-K. (2008): Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1553–1558
- Park J.K.; Chang H.N. (2000): Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18, 303-319
- Park J.Y., Lee S.O., Lee T.H. (1999): Syntheses of 1-O-benzyl- α -glucoside and 1-O-benzyl- α -maltoside by transglycosylation of α -amylase from soluble starch in aqueous solution. *Biotechnology Letters*, 21, 81–86
- Park M.C.; Lim J.S.; Kim J.C.; Park S.W.; Kim S.W. (2005): Continuous production of neo-fructooligosaccharides by immobilization of whole cells of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters*, 27, 127-130
- Park N.-Y., Baek N.-I., Cha J., Lee S.-B., Auh J.-H., Park C.-S. (2005). Production of a new sucrose derivative by transglycosylation of recombinant *Sulfolobus shibatae* β -glycosidase. *Carbohydrate Research*, 340, 1089-1096
- Park T.H., Choi K.W., Park C.S., Lee S.B. (2005): Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a thermostable β -glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5, 1–12
- Pascal G. (2008): Prebiotics and food safety. W: *Handbook of Prebiotics*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i M.B. Roberfroid), Taylor & Francis Group, LLC, 449-470

- Pashova S.; Slokoska L.; Krumova E.; Angelova M. (1999): Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger* 26. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 535-540
- Perugino G., Trincone A., Rossi M., Moracci M. (2004): Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in Biotechnology*, 22, 31-37
- Petzelbauer I., Zeleny R., Reiter A., Kulbe K.D., Nidetzky B. (2000): Development of an ultra-high-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose: II. Oligosaccharide formation by two thermostable β -glucosidases. *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 140–149
- Pisani F.M., Rella R., Raia c.A., Rozzo C., Nucci R., Gambacorta A., de Rosa M., Rossi M. (1990): Thermostable β -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties. *European Journal of Biochemistry*, 2, 187, 321-328
- Plou F.J., de Segura A.G., Ballesteros A. (2007): Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides. W: *Industrial Enzymes. Structure, functions and applications*. (Praca zbiorowa pod redakcją J. Polaina i A.P. MacCabe) Springer, Holandia, str. 141-157
- Pometto III A.L.; Crawford D.L. (1983): Whole-cell bioconversion of vanillin to vanillic acid by *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1582-1585
- Prade H., Mackenzie L.F., Withers S.G. (1998): Enzymatic synthesis of disaccharides using *Agrobacterium* sp. β -glucosidase. *Carbohydrate Research*, 305, 371 – 381
- Prado F.C., Parada J.L., Pandey A., Soccol C.R. (2008): Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41, 111-123
- Prapulla S.G., Subhaprada V., Karanth N.G. (2000): Microbial production of oligosaccharides: a review. *Advances in Applied Microbiology*, 47, 299-343
- Prenosil J.E., Stuker E., Bourne J.R. (1987): Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis: Part I: State of art. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 1026–1031
- Qian X., Sujino K., Palcic M.M., Ratcliffe R.M. (2002): Glycosyltransferases in oligosaccharide synthesis. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 21, 911-942.
- Ramakrishna S.V., Prakasham R.S. (1999): Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science*, 77: 87-100
- Rastall R.A., Fuller R., Gaskins H.R., Gibson G.R. (2000): Colonic functional foods. W: *Functional Foods. Concept to Product*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i C.M. Williams). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Anglia, str. 71-96
- Ravet C., Thomas D., Legoy M.D. (1993). Gluco-oligosaccharide synthesis by free and immobilized β -glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 303 – 308
- Rinaudo M. (2006): Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632
- Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y. (2010): Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27,1-11
- Roberfroid M.B. (2000): Defining functional foods. W: *Functional Foods. Concept to Product*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i C.M. Williams). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Anglia, str. 9-27
- Roberfroid M.B. (2002): Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, Suppl. 2, 133-138
- Roberfroid M.B. (2007): Prebiotics: concept revisited. *Journal of Nutrition*, 137, 830S-837S
- Roberfroid M.B. (2008): Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies and products. W: *Handbook of Prebiotics*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i M.B. Roberfroid), Taylor & Francis Group, LLC, str. 39-68
- Roessl U., Nahálka J., Nidetzky B. (2010): Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnology Letters*, 32, 341–350
- Rotthaus O.; Demuth M. (2002): Efficient cyclization of squalene epoxide to lanosterol with immobilized cells of baker's yeast. *Tetrahedron*, 58, 7291-7293
- Roy I., Gupta M.N. (2006): Bioaffinity immobilization. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 107-116

- Rubio-Teixeira M.; Arévalo-Rodríguez M.; Lequerica J.L.; Polaina J. (2000): Lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis* LAC genes. *Journal of Biotechnology*, 84, 97-106
- Ruffing A., Chen R.R. (2006): Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. *Microbial Cell Factories* 5, 25
- Rustom I.Y.S., Foda M.I., López-Leiva M.H. (1998). Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis- analysis of factors. *Food Chemistry*, 62, 141 - 147
- Ryckaert S.; Martens V.; De Vusser K.; Contreras R. (2005): Development of *S. cerevisiae* whole cell biocatalyst for *in vitro* sialylation of oligosaccharides. *Journal of Biotechnology*, 119, 379-388
- Rye C.S., Withers S.G. (2000): Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 573-580
- Salani F.; Bianchi M.M. (2006): Production of glucoamylase in pyruvate decarboxylase deletion mutants of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 69, 564-572
- Saleemuddin M., Husain Q. (1991): Concanavalin A: a useful ligand for glycoenzyme immobilization- a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 13, 290-295
- Salminen S., Gueimonde M. (2005): Human studies on probiotics: what is scientifically proven. *Journal of Food Science*, 5, 69, M137-M140
- Schumann C. (2002): Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *European Journal of Nutrition*, 41 (Suppl 1), I/17-I/25
- Schuster-Wolff-Bühning R., Fischer L., Hinrichs J. (2010): Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *International Dairy Journal*, DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.05.004
- Scigelova M., Singh S., Crout D.H.G. (1999). Glycosidases- a great synthetic tool. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6, 483 – 494
- Seifert S., Waltz B. (2008): Probiotics and the immune system: review of experimental and human data. W: *Handbook of Probiotics*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i M.B. Roberfroid), Taylor & Francis Group, LLC, str. 143-162
- Seong G.H.; Han S.J.; Chang H.N.; Lee J. (1997): Whole cell enzyme microencapsulation of *Escherichia coli* with oxygen-dependent inducible *nar* promoter. *Biotechnology Letters*, 19, 881-884
- Seto A.; Yoshijima H.; Toyomasu K.; Ogawa H-O.; Kakuta H.; Hosono K.; Ueda K.; Beppu T. (2004): Effective extracellular trehalose production by *Cellulosimicrobium cellulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 794-799
- Sheldon R.A., Schoevaert R., van Langen L.M. (2006): Cross-linked enzyme aggregates. W: *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Second edition* (Praca zbiorowa pod redakcją J.M. Guisan) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, str. 31-45
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 5, 68, 850-858
- Siró I., Kápolna E., Kápolna B., Lugasi A. (2008): Functional Food. Product development, marketing and consumer acceptance- a review. *Appetite*, 51, 456-467
- Siso M.I.G.; Cerdán E.; Picos M.A.F.; Ramil E.; Belmonte E.R.; Torres A.R. (1992): Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for milk whey saccharification: a comparison of different treatments. *Biotechnology Techniques*, 6, 289-292
- Splechtna B., Petzelbauer I., Baminger U., Haltrich D., Kulbe K.D., Nidetzky B. (2001): Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 434-440
- Sudbery P.E. (1996): The expression of recombinant proteins in yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 517-524
- Swennen K.; Courtin C.M.; Delcour J.A. (2006): Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science*, 46, 459-471
- Synowiecki J.; Maciuńska J. (2002): Isolation and some properties of the thermostable β -galactosidase of *Pyrococcus woesei* expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Food Biochemistry*, 26, 49-62

- Szilagyi A. (2002): Review article: lactose- a potential prebiotic. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 16, 1591-1602
- Szilagyi A. (2004): Redefining lactose as a conditional prebiotic. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 3, 18, 163-167
- Terpe K. (2003): Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 523–533
- Thippeswamy S., Mulimani V.H. (2002): Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochemistry*, 38, 635-640
- Timoharju T., Leisola M., Turunen O. (2009): Lactulose synthesis by *Sulfolobus acidocaldarius* β -galactosidase. 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Ischia, Neapol, Włochy
- Tong A.-M., Xu J.-H., Lu W.-Y., Lin G.-Q. (2005). Construction and optimization of a monophasic organic-water system for enzymatic synthesis of *p*-nitrobenzyl β -D-glucopyranosides by reverse hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32, 83–88
- Toone E.J., Simon E.S., Bednarski M.D., Whitesides G.M. (1989): Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron*, 45, 5365–5422
- Tzortzis G., Goulas A.K., Gibson G.R. (2005): Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 412–416
- van Rantwijk F., Woudenberg-van Oosterom M., Sheldon R.A. (1999): Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6, 511–532
- Vic G., Biton J., Le Beller D., Michel J.-M., Thomas D. (1995): Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis reaction using almond- β -D-glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 109 – 116
- Vic G., Crout D.G.H. (1995): Synthesis of allyl and benzyl β -D-glucopyranosides, and allyl β -D-galactopyranoside from D-glucose or D-galactose and the corresponding alcohol using almond β -D-glucosidase. *Carbohydrate Research*, 279, 315 – 319
- Vic G., Hastings J.J., Crout D.H.G. (1996): Glycosidase-catalysed synthesis of glycosides by an improved procedure for reversed hydrolysis: application to the chemoenzymatic synthesis of galactopyranosyl-(1→4)-O- α -galactopyranoside derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7, 1973–1984
- Vos A.P., M'Rabet L., Stahl B., Boehm G., Garssen J. (2007): Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Critical Reviews in Immunology*, 27 (2), 97-140
- Wanarska M. (2005): Termostabilna β -galaktozydaza *Pyrococcus woesei*- konstrukcja nowych systemów ekspresyjnych, oczyszczanie, charakterystyka i immobilizacja enzymu. Rozprawa doktorska. Politechnika Gdańska
- Wang A.A., Mulchandani A., Chen W. (2001): Whole-cell immobilization using cell surface-exposed cellulose-binding domain. *Biotechnology Progress*, 17, 407-411
- Wang L-X., Huang W. (2009): Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 13, 592-600
- Wang Y. (2009): Prebiotics: present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42, 8-12
- Watt G.M., Lowden P.A.S., Flitsch S.L. (1997): Enzyme-catalyzed formation of glycosidic linkages. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 652 – 660
- Weichselbaum E. (2009): Probiotics and health: a review of the evidence. *Nutrition Bulletin*, 34, 340-373
- Weijers C.A.G.M., Franssen M.C.R., Visser G.M. (2008): Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26, 436-456
- Wells A.L., Saulnier D.M.A., Gobson G.R. (2008): Gastrointestinal microflora and interactions with gut mucosa. W: *Handbook of Prebiotics*. (Praca zbiorowa pod redakcją G.R. Gibson i M.B. Roberfroid), Taylor & Francis Group, LLC, str. 13-38

- White A., Rose D.R. (1997): Mechanism of catalysis by retaining β -glycosyl hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 645 – 651
- Williams G.J., Gantt R.W., Thorson J.S. (2008): The impact of enzyme engineering upon natural product glycodiversification. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 556-564
- Williams S. (2010): Glycosyltransferases. *CAZypedia*, <http://www.cazypedia.org/>
- Williams S.J., Withers S.G. (2000): Glycosyl fluorides in enzymatic reactions. *Carbohydrate Research*, 327, 27-46
- Wilms B.; Wiese A.; Syldatk C.; Mattes R.; Altenbuchner J. (2001): Development of an *Escherichia coli* whole cell biocatalyst for the production of L-amino acids. *Journal of Biotechnology*, 86, 19-30
- Withers S.G. (2001): Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, 44, 325-337
- Withers S.G., Williams S. (2010): Glycosidases. *CAZypedia*, <http://www.cazypedia.org/>
- Wołosowska S. (2006): Otrzymywanie i właściwości preparatów unieruchomionej termostabilnej β -glukozydazy z *Sulfolobus shibatae*. Rozprawa doktorska. Politechnika Gdańska
- Woudenberg-van Oosterom M., van Belle H.J.A., van Rantwijk F., Sheldon R.A. (1998): Immobilised β -galactosidases and their use in galactoside synthesis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 134, 267-274
- Woźniak-Kosek A., Jarosz M. (2005a): Probiotyki a żywienie człowieka. *Żywnie Człowieka i Metabolizm*, 1, 32, 72-83
- Woźniak-Kosek A., Jarosz M. (2005b): Probiotyki a prewencja i leczenie chorób przewodu pokarmowego człowieka. *Żywnie Człowieka i Metabolizm*, 4, 32, 266-275
- Zambianchi F.; Raimondi S.; Pasta P.; Carrea G.; Gaggero N.; Woodley J.M. (2004): Comparison of cyclohexanone monooxygenase as an isolated enzyme and whole cell biocatalyst for the enantioselective oxidation of 1,3-dithiane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31, 165-171
- Zhao F.; Yu J. (2001): L-Asparaginase release from *Escherichia coli* with K_2HPO_4 and Triton X100. *Biotechnology Progress*, 17, 490-494
- Zhou Z-d., Li G-y., Li Y-j. (2010): Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate–chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 21–26
- Zokaee F.; Kaghazchi T.; Zare A.; Soleimani M. (2002): Izomerization of lactose to lactulose- study and comparison of three catalytic systems. *Process Biochemistry*, 37, 629-635