

# Galaktooligosaharidi - sinteza i primjena

---

Stajku, Erza

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:680542>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Erza Stajku

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Erza Stajku

Predala je izrađen završni rad dana: 17. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Martina Sudar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Monika Šabić Runjavec, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 20. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Erza Stajku

GALAKTOOLIGOSAHARIDI – SINTEZA I PRIMJENA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

izv. prof. dr. sc. Martina Sudar

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2024.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na uloženom vremenu i pruženoj pomoći prilikom izrade ovog završnog rada.*

*Najveća zahvala mojim roditeljima što su mi omogućili ovaj studij i bili najveća podrška tijekom studiranja.*

## SAŽETAK

Galaktooligosaharidi kao skupina oligosaharida koja se zbog svoje strukture i svojstava neprobavljivosti u gornjem dijelu probavnog sustava ubraja u skupinu prebiotika sve se više proučava. Njihov prebiotički učinak najviše je izražen u donjem dijelu probavnog sustava – u debelom crijevu budući da tamo postaju hrana za korisne bakterije i samim time pospješuju njihov rast. Korisne bakterije poput bifidobakterija i laktobacila potrebne su u što većem broju zbog svog pozitivnog učinka na crijevnu mikrofloru.

Po kemijskoj strukturi, spojevi su koji se sastoje od lanca molekula galaktoze koje su glikozidnim vezama povezane na molekulu glukoze. Cilj ovog rada jest upoznati se sa sintezom ovih spojeva iz raznih supstrata, konkretno laktoze te istražiti gdje se sve oni mogu primijeniti. Sinteza galaktooligosaharida provodi se pomoću enzima poput  $\beta$ -galaktozidaze koji razgrađuju laktozu (disaharid koji se sastoji od glukoze i galaktoze) i potom kataliziraju prijenos galaktoznih jedinica na različite akceptorske molekule. Kao prebiotički spojevi, svoju primjenu nalaze prvenstveno u prehrambenoj industriji, a potom i u farmaceutskoj i kozmetičkoj. Također, pomažu u očuvanju zdravlja kostiju te jačanju imunološkog sustava.

**Ključne riječi:** galaktooligosaharidi, prebiotici, probavni sustav, korisne bakterije, laktoza, enzimska sinteza,  $\beta$ -galaktozidaza

## ABSTRACT

Galactooligosaccharides, a group of oligosaccharides that are classified as prebiotics due to their structure and indigestibility in the upper part of the digestive system, are increasingly being studied. Their prebiotic effect is most pronounced in the lower part of the digestive system—in the colon—since they become food for beneficial bacteria there, thereby promoting their growth. Beneficial bacteria such as bifidobacteria and lactobacilli are needed in large numbers due to their positive effect on the intestinal microflora.

By chemical structure, these are compounds consisting of a chain of galactose molecules linked to a glucose molecule by glycosidic bonds. The aim of this work is to explore the synthesis of these compounds from various substrates, specifically lactose, and to investigate their potential applications. The synthesis of galactooligosaccharides is carried out using enzymes like  $\beta$ -galactosidase, which break down lactose (a disaccharide consisting of glucose and galactose) and then catalyze the transfer of galactose units to different acceptor molecules. As prebiotic compounds, they are primarily used in the food industry, and also in the pharmaceutical and cosmetic industries. Additionally, they help in maintaining bone health and strengthening the immune system.

**Keywords:** galactooligosaccharides, prebiotics, digestive system, beneficial bacteria, lactose, enzymatic synthesis,  $\beta$ -galactosidase

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. Prebiotici .....	2
2.2. Galaktooligosaharidi .....	5
2.2.1. Kemijska struktura .....	5
2.3. Biološka važnost i funkcija galaktooligosaharida .....	8
2.4. Enzimski procesi .....	10
2.4.1. Enzimi .....	10
2.4.2. Struktura enzima .....	10
2.4.3. Teorija o djelovanju enzima .....	11
2.4.4. Kinetika biokatalitičkih reakcija .....	12
2.4.5. Klasifikacija enzima .....	13
2.4.6. Prednosti i nedostaci biokatalizatora .....	13
2.5. Enzimaska sinteza galaktooligosaharida .....	14
2.6. Primjena galaktooligosaharida .....	23
3. ZAKLJUČAK .....	26
4. LITERATURA .....	28
5. POPIS SIMBOLA .....	36
6. ŽIVOTOPIS .....	37



# 1. UVOD

Galaktooligosaharidi (GOS) ubrajaju se u skupinu oligosaharida koji se prirodno nalaze u majčinom mlijeku, a također mogu nastati sintezom u industrijskim procesima. Oni su prebiotici, tvari koje selektivno potiču rast korisnih bakterija u crijevima, poput bifidobakterija i laktobacila. Ove su nam bakterije korisne jer imaju ključnu ulogu u održavanju zdrave crijevne mikroflore, što ima brojne pozitivne učinke na zdravlje čovjekova organizma.<sup>1</sup>

Zbog svoje strukture, galaktooligosaharidi se ne mogu probaviti u gornjem dijelu probavnog trakta te se na taj način omogućava da oni netaknuti stignu do debelog crijeva gdje postaju hrana za korisne bakterije. Zbog ove karakteristike, GOS smatramo važnim sastojkom u mnogim funkcionalnim prehrambenim proizvodima, a posebno u dječjoj hrani, gdje se koriste kao dodatak sličan onome koji nalazimo u majčinom mlijeku.<sup>2</sup> Galaktooligosaharide možemo sintetizirati putem enzimskih procesa, koristeći enzime poput  $\beta$ -galaktozidaza koji kataliziraju transformaciju laktoze u galaktooligosaharide.<sup>3</sup>

Ovi procesi sinteze omogućuju proizvodnju GOS na komercijalnoj razini, čime se zadovoljava rastuća potražnja za prebionicima u prehrambenoj industriji. No, njihova primjena se ne ograničava samo na prehrambenu industriju. Zdravstvene prednosti, uključujući poboljšanje imunološkog sustava, prevenciju bolesti probavnog sustava i poboljšanu apsorpciju minerala, čine ih korisnima i u farmaceutskim proizvodima. Pored toga, GOS nalaze primjenu i u kozmetičkoj industriji te biotehnologiji.<sup>4</sup>

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Prebiotici

Prebiotici su definirani kao neprobavljivi sastojci hrane koji blagotvorno utječu na domaćina tako što selektivno stimuliraju rast i aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu i tako poboljšavaju zdravlje domaćina.<sup>5</sup> Kako je počelo njihovo istraživanje, koncept prebiotika privukao je veliku pozornost, što za znanstvene, što za industrijske interese. Ne pripadaju svi ugljikohidrati koje koristimo u prehrani skupini prebiotika, stoga je potrebno uspostaviti jasne kriterije pomoću kojih određujemo pripadnost sastojaka hrane prebioticima.<sup>6</sup> Međutim, za mnoge komponente hrane, posebno za mnoge oligosaharide i polisaharide (uključujući dijetalna vlakna), smatra se da imaju prebiotičku aktivnost bez nužnog razmatranja potrebnih kriterija.<sup>7</sup> Kriteriji pomoću kojih ih određujemo odnose se na otpornost na želučanu kiselost, na hidrolizu enzimima sisavaca i na probavnu apsorpciju; fermentaciju pomoću crijevne mikroflore; i selektivnu stimulaciju rasta i/ili aktivnosti onih crijevnih bakterija (bifidobakterija i laktobacila) koje pridonose zdravlju i dobrobiti.<sup>8</sup>

Otpornost na želučanu kiselost, u prvom kriteriju, ne znači nužno da je prebiotik potpuno neprobavljiv, ali važno je osigurati da je značajna količina spoja dostupna u crijevima, (osobito debelom crijevu) da može služiti kao supstrat za fermentaciju.<sup>9</sup> Iako je svaki od navedenih kriterija važan, najteže je ispuniti kriterij selektivne stimulacije rasta i aktivnosti samo onih crijevnih bakterija koje pridonose zdravlju i dobrobiti.<sup>10</sup>

Dokazivanje selektivne stimulacije rasta i/ili aktivnosti ovih crijevnih bakterija koje pridonose zdravlju i dobrobiti zahtijeva anaerobno uzorkovanje fecesa praćeno pouzdanom i kvantitativnom mikrobiološkom analizom širokog spektra bakterijskih rodova, npr. ukupnih aeroba/anaeroba, bakteroida, bifidobakterija, klostridija, enterobakterija, eubakterija i laktobacila.<sup>10</sup> S vremenom su razvijene razne molekularne mikrobiološke metode koje bi trebale olakšati razumijevanje djelovanja prebiotika. Za praćenje stimulacije bakterijske aktivnosti korišteni su mehanizmi proizvodnje organskih kiselina, plinova i enzima, no oni još nisu potvrđeni kao biološki indikatori specifičnih bakterijskih rodova.<sup>11</sup>

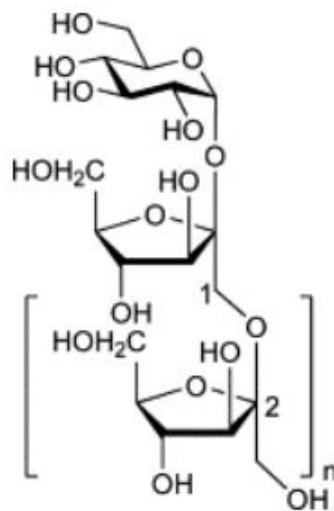
Prebiotici imaju važnu ulogu u ljudskom zdravlju. Prirodno ih nalazimo u različitim dijetalnim prehrambenim proizvodima, uključujući šparoge, šećernu repu, češnjak, cikoriju, luk, pšenicu, med, bananu, ječam, rajčicu, raž, soju, ljudsko i kravlje mlijeko, grašak, grah, a također i u morskoj travi i mikroalgama. Zbog niske koncentracije u hrani, proizvode se u

industrijskom mjerilu.<sup>12</sup> Neki od prebiotika proizvode se od sirovina kao što su laktoza, saharoza i škrob.<sup>5</sup>

Otkriveno je da postoje mnoge vrste prebiotika. Većina njih pripada u ugljikohidrate i uglavnom su to oligosaharidi. Također postoje i prebiotici koji nisu ugljikohidrati.<sup>13</sup>

### Fruktani

Fruktani su kategorija oligosaharida čiji su glavni predstavnici inulin (slika 1) i frukto-oligosaharidi ili oligofruktoze. Njihova struktura uključuje linearni lanac fruktoze s  $\beta(2\rightarrow1)$  vezom. Fruktani mogu selektivno stimulirati rast bakterija mliječne kiseline.<sup>14</sup> Daljnja istraživanja pokazala su da je duljina lanca fruktana važan kriterij za određivanje vrste bakterija koje ih mogu fermentirati. Stoga fruktani mogu izravno ili neizravno poticati rast i drugih bakterijskih vrsta.<sup>15</sup>

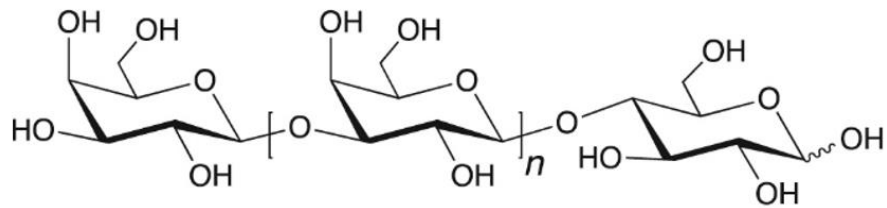


**Slika 1.** Kemijska struktura fruktana – inulina<sup>15</sup>

### Galaktooligosaharidi

Galaktooligosaharidi su produkti ekstenzije laktoze (slika 2) koji se klasificiraju u dvije podskupine: GOS s viškom galaktoze na C3, C4 ili C6 te GOS proizveden iz laktoze enzimskom

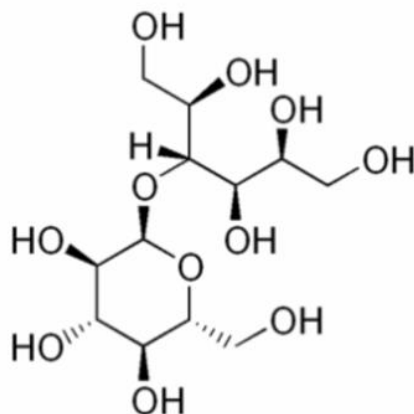
transglikozilacijom. Krajnji produkt ove reakcije uglavnom je mješavina tri- do pentasaharida s galaktozom u  $\beta(1\rightarrow6)$ ,  $\beta(1\rightarrow3)$  i  $\beta(1\rightarrow4)$  vezama.<sup>16</sup>



**Slika 2.** Kemijska struktura galaktooligosaharida

Oligosaharidi izvedeni iz škroba i glukoze

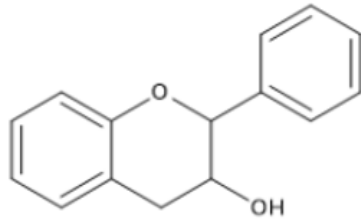
Postoji vrsta škroba koja je otporna na probavu u gornjem dijelu crijeva poznata kao rezistentni škrob. On može pozitivno utjecati na zdravlje proizvodnjom visoke razine butirata; pa je predloženo da se svrsta u prebiotike.<sup>17</sup> Oligosaharid koji se dobiva iz glukoze naziva se polidekstroza (slika 3). Sastoji se od glukana s puno grana i glikozidnih veza te stimulira rast bifidobakterija.<sup>18</sup>



**Slika 3.** Kemijska struktura polidekstroze<sup>18</sup>

## Prebiotici koji nisu ugljikohidrati

Iako je vjerojatnije da će ugljikohidrati ispuniti kriterije definicije prebiotika, postoje neki spojevi koji nisu klasificirani kao ugljikohidrati, ali se također preporučuju za klasifikaciju kao prebiotici, kao što su flavanoli dobiveni iz kakaovca (slika 4). Istraživanjima se pokazalo da flavanoli mogu stimulirati aktivnost bakterije mliječne kiseline.<sup>19</sup>



**Slika 4.** Kemijska struktura flavanola<sup>20</sup>

## 2.2. Galaktooligosaharidi

Galaktooligosaharidi (GOS) prebiotički su spojevi koji se sastoje od nekoliko molekula galaktoze vezanih na glukozu pomoću glikozidnih veza. Prirodno ih nalazimo u majčinom mlijeku i pokazali su vrlo pozitivne učinke na probavni sustav jer potiču rast korisnih bakterija poput bifidobakterija i laktobacila. Obično nastaju enzimskim procesom sinteze iz laktoze koja se sastoji od jedne molekule glukoze i galaktoze.<sup>21</sup>

### 2.2.1. Kemijska struktura

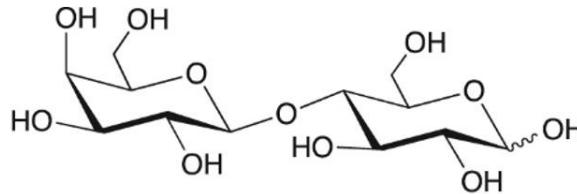
Osnovna jedinica od koje su sastavljeni galaktooligosaharidi je galaktoza. Najjednostavniji GOS sadrži tek jednu jedinicu galaktoze i naziva se monosaharid, ali obično se GOS sastoji od dvije do osam galaktoznih jedinica povezanih  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glikozidnim vezama.<sup>22</sup>

Osnovne strukture galaktooligosaharida<sup>23</sup>:

Laktoza (osnovni disaharid):

Struktura: Galaktoza- $\beta(1\rightarrow4)$ -Glukoza ili skraćeno: Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -Glc (slika 5)

Kemijska formula:  $C_{12}H_{22}O_{11}$

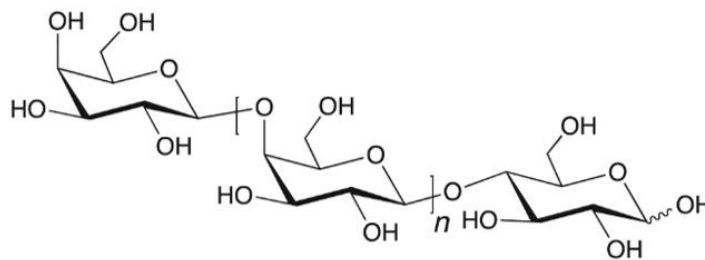


**Slika 5.** Kemijska struktura disaharida – laktoze<sup>23</sup>

GOS s dvije galaktozne jedinice (trisaharid):

Struktura: Galaktoza- $\beta(1\rightarrow4)$ -Galaktoza- $\beta(1\rightarrow4)$ -Glukoza (slika 6)

Kemijska formula:  $C_{18}H_{32}O_{16}$

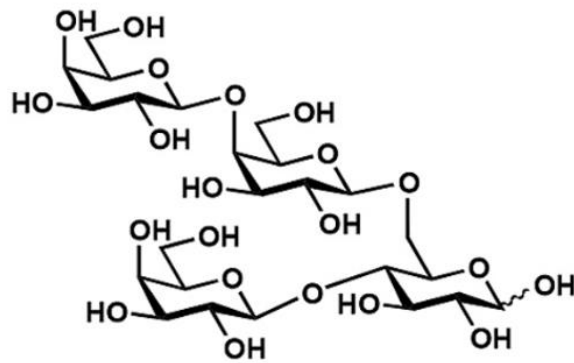


**Slika 6.** Kemijska struktura trisaharida<sup>23</sup>

GOS s tri galaktozne jedinice (tetrasaharid):

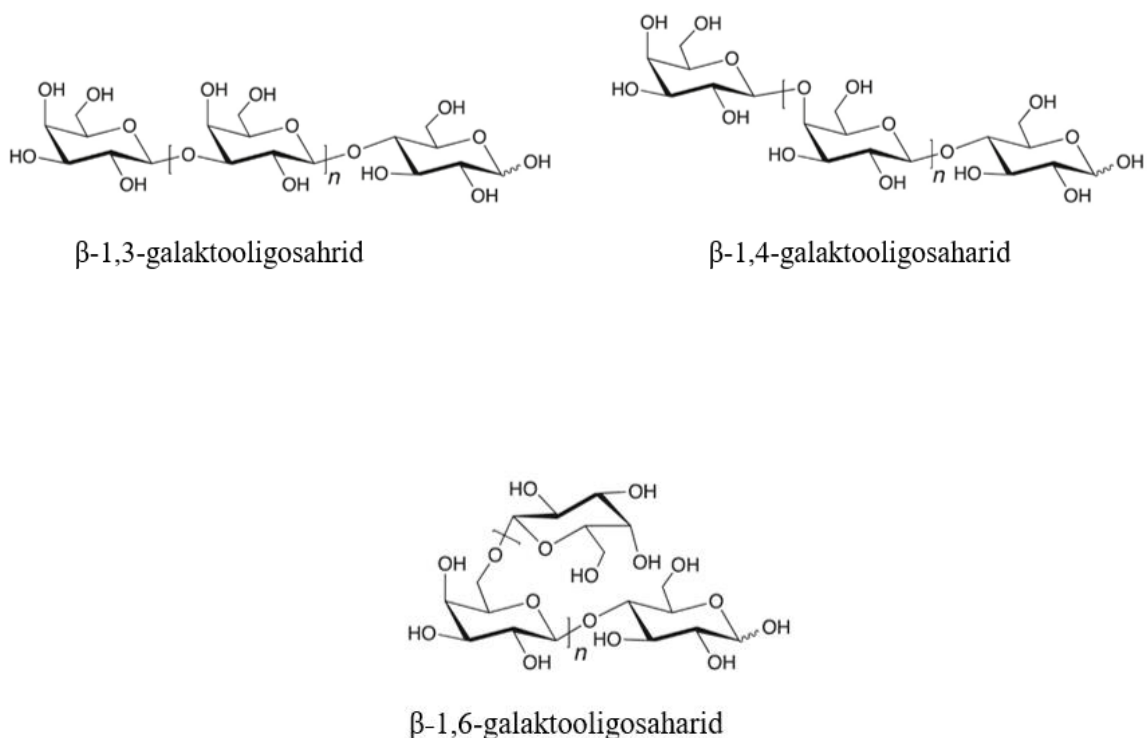
Struktura: Galaktoza- $\beta(1\rightarrow4)$ -Galaktoza- $\beta(1\rightarrow4)$ -Galaktoza- $\beta(1\rightarrow4)$ -Glukoza (slika 7)

Kemijska formula:  $C_{24}H_{42}O_{21}$



**Slika 7.** Kemijska struktura tetrasaharida<sup>23</sup>

Općenito galaktooligosaharidi mogu imati različite strukture ovisno o položaju glikozidne veze i broju galaktoznih jedinica. Najčešće veze su  $\beta(1\rightarrow3)$ ,  $\beta(1\rightarrow4)$  i  $\beta(1\rightarrow6)$  te su strukture galaktooligosaharida nastale ovisno o tim vezama prikazane na slici 8. Oznaka " $\beta$ " (beta) označava konfiguraciju veze u odnosu na anomerni ugljik prve monosaharidne jedinice. U  $\beta$ -vezi, glikozidna veza je iznad ravnine prstena.<sup>24</sup> Nadalje, brojevi 1 i 3 označavaju ugljikove atome na dvije monosaharidne jedinice koje su povezane. Prvi broj (u ovom slučaju 1) označava anomerni ugljik prve monosaharidne jedinice, a drugi broj (3) označava ugljik na drugoj jedinici koji je vezan za anomerni ugljik prve jedinice. Izraz anomerni ugljik odnosi se na onaj ugljik na kojem se nalazi glikozidna veza.<sup>23,24</sup>



**Slika 8.** Glikozidne veze u galaktooligosaharidima<sup>24</sup>

### 2.3. Biološka važnost i funkcija galaktooligosaharida

Galaktooligosaharidi poznati su po svojim prebiotičkim svojstvima što podrazumijeva selektivno stimuliranje rasta i aktivnosti korisnih bakterija u crijevima, kao i inhibiciju rasta patogenih mikroorganizama.<sup>21</sup> GOS i drugi prebiotici sve su više prepoznati kao korisni prehrambeni alati za regulaciju ravnoteže mikrobiote debelog crijeva i ljudskog zdravlja.<sup>22</sup>

Poznate korisne bakterije u crijevima koje rastu uz pomoć galaktooligosaharida su bifidobakterije i laktobacili te one pomažu u poboljšanju crijevne mikroflore što doprinosi boljem zdravlju crijeva.<sup>27</sup>

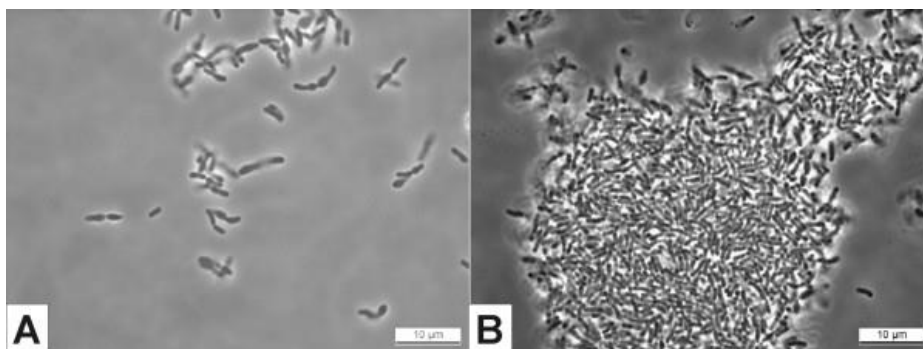
Tanaka i suradnici 1983. proveli su istraživanja koja se odnose na neprobavljivost GOS-a i na brojnost bifidobakterija te su rezultati dobiveni testovima s vodikovim disanjem.<sup>25</sup> Izlučivanje vodika dahom učinak je ovisan o dozi. Koristeći ovu neinvazivnu tehniku, nekoliko je studija izvijestilo o povećanom izlučivanju vodika kada je unesena količina GOS-a bila



između 15 do 35 g/dan, što ukazuje da su GOS izbjegli probavu i da su fermentirani u mikrobioti debelog crijeva.<sup>25,26</sup>

Međutim, Bouhnik i suradnici (1997.) pokazali su da nastaje smanjena koncentracija vodika u dah nakon primjene dnevne doze od 10 g GOS-a, ali su u isto vrijeme povećan broj bifidobakterija, što ukazuje da su GOS-i bili fermentirani mikrobiotom debelog crijeva.<sup>10</sup>

Bifidobakterije (slika 9) su korisne jer mogu proizvoditi mliječnu kiselinu, koja može zakiseliti crijevnu okolinu, ograničiti rast patogenih bakterija i poboljšati funkciju barijere sluznice.<sup>27</sup>



**Slika 9.** Mikroskopska slika bifidobakterija<sup>28</sup>

Kao neprobavljiva komponenta hrane, GOS može proći kroz gornji dio gastrointestinalnog trakta relativno netaknut i fermentirati se u debelom crijevu kako bi proizveo kratkolančane masne kiseline koje dalje reguliraju tjelesnu crijevnu floru.<sup>22</sup>

Otkriveno je da ljudsko debelo crijevo sadrži približno 1014 različitih bakterijskih vrsta, a crijevna mikrobiota sastoji se od približno 500 različitih anaerobnih vrsta.<sup>29</sup> Metaboličke aktivnosti ovih bakterija mogu imati velike učinke na fiziološke procese ljudskog domaćina.<sup>30</sup> Povećani broj bifidobakterija u crijevima može spriječiti aktivnost bakterija kvarenja kao što je *Clostridium* spp., čime se smanjuje stvaranje toksičnih produkata fermentacije.<sup>31</sup> U zdravih osoba postoji ravnoteža između crijevne mikrobiote i patogenih bakterija. Kada je ta ravnoteža poremećena, funkcija crijevne barijere je narušena. Slom funkcije crijevne barijere i imunološke funkcije povezan je s razvojem sindroma disfunkcije više organa i sindroma sustavnog upalnog odgovora.<sup>32</sup>

Nadalje, GOS selektivno potiču umnožavanje stanica probiotika - živih mikroorganizama (korisnih bakterija) koji poboljšavaju mikrobnu ravnotežu u probavnom

sustavu,<sup>33</sup> inhibiraju rast i adheziju patogenih bakterija, ublažavaju gastrointestinalne, neurološke, metaboličke i alergijske bolesti, moduliraju proizvodnju metabolita te prilagođavaju skladištenje i apsorpciju iona. Sigurni su i stabilni, s visokom topljivošću i čistim okusom, pa se naširoko koriste kao dodaci hrani. GOS može poboljšati izgled, okus, teksturu, viskoznost, reološka svojstva, rok trajanja i zdravstvene prednosti prehrambenih proizvoda.<sup>34</sup>

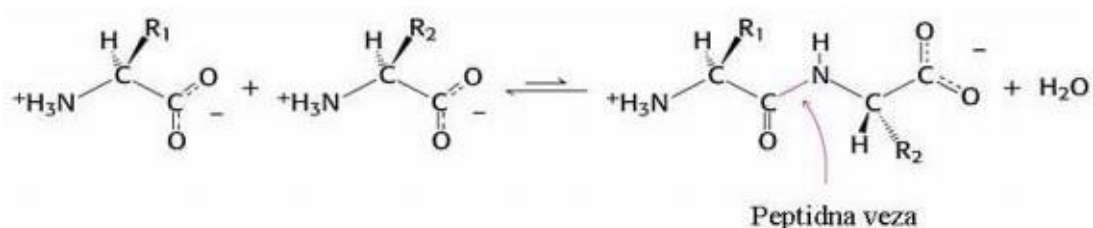
## 2.4. Enzimski procesi

### 2.4.1. Enzimi

Biokatalizatori ili enzimi tvari su biološkog podrijetla koje ubrzavaju kemijske reakcije potrebne za održavanje životnih funkcija. Oni djeluju unutar živih organizama, ali i izvan njih, primjerice u laboratorijskim uvjetima. Industrijski proizvedeni enzimi služe kao izuzetno aktivni katalizatori te sudjeluju u brojnim procesima.<sup>35</sup>

### 2.4.2. Struktura enzima

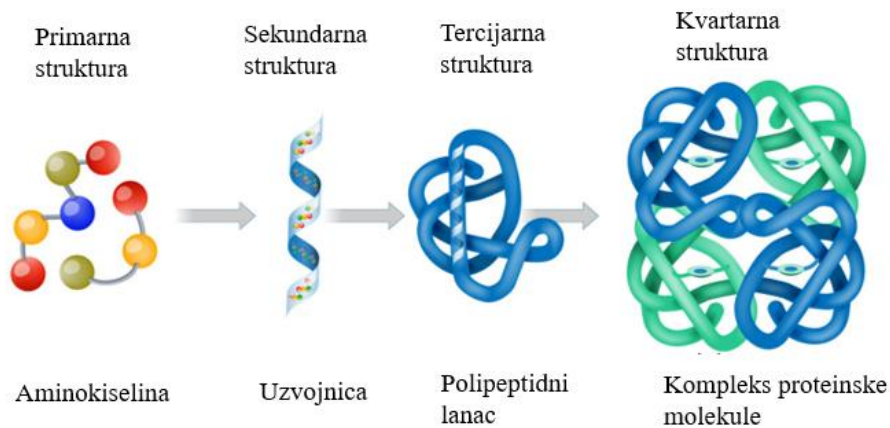
Pri formiranju enzima, ključna je peptidna veza koja povezuje dvije aminokiseline u polipeptidnom lancu te je njeno nastajanje prikazano na slici 10. Peptidna veza nastaje kondenzacijskom reakcijom između karboksilne grupe jedne aminokiseline i amino grupe druge aminokiseline, uz oslobađanje molekule vode.<sup>36</sup>



Slika 10. Nastajanje peptidne veze<sup>36</sup>

Enzimi se strukturno opisuju pomoću četiri različite strukture: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna (slika 11). Primarna struktura sastoji se od aminokiselina povezanih određenim redoslijedom koje čine peptidne lance, a redoslijed povezivanja aminokiselina određuje funkciju biokatalizatora. Sekundarna struktura nastaje kad se peptidni lanci povežu preko vodikovih veza koje stabiliziraju ovu strukturu. Kod sekundarne strukture, postoje dvije

možnosti: planarna struktura i struktura uzvojnice. Aktivni enzimi mogu biti samo oni tercijarne i kvartarne građe. Tercijarna struktura nastaje preklapanjem peptidnih lanaca. Kvartarna struktura, ujedno i najkompleksnija, izgrađena je od nekoliko podjedinica. Proteini kvartarne strukture su globularni proteini te ujedno čine i najbolje biokatalizatore.<sup>37</sup>

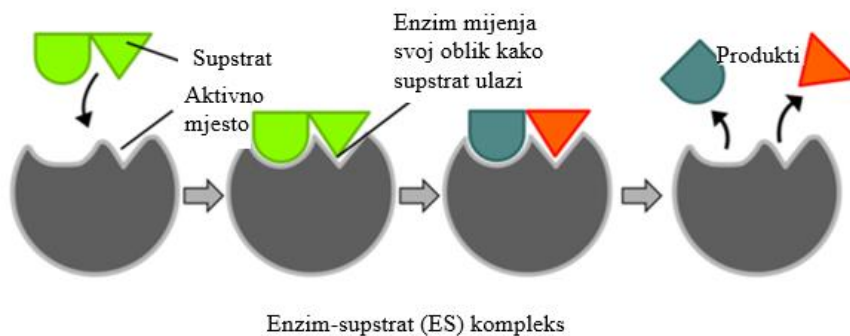


**Slika 11.** Struktura enzima<sup>38</sup>

### 2.4.3. Teorija o djelovanju enzima

Teorija o djelovanju enzima (biokataliza) objašnjava kako enzimi djeluju kao biokatalizatori, ubrzavajući kemijske reakcije smanjenjem energije aktivacije. Predložene su dvije najvažnije teorije vezanja supstrata na aktivno mjesto enzima, a to su model ključ-brava i model pobuđene prilagodbe.<sup>39</sup> Prema modelu ključ-brava, predloženom od Emila Fischera 1894. godine, aktivno mjesto enzima ima specifičan oblik koji odgovara obliku supstrata, slično kao ključ bravi. Ovaj model pretpostavlja da pri vezanju supstrata na aktivno mjesto nastaje međukompleks enzim-supstrat (ES) koji je vidljiv na slici 12. To omogućuje vrlo specifičnu interakciju, odnosno onemogućeno je vezanje molekula neodgovarajućeg oblika.<sup>36</sup>

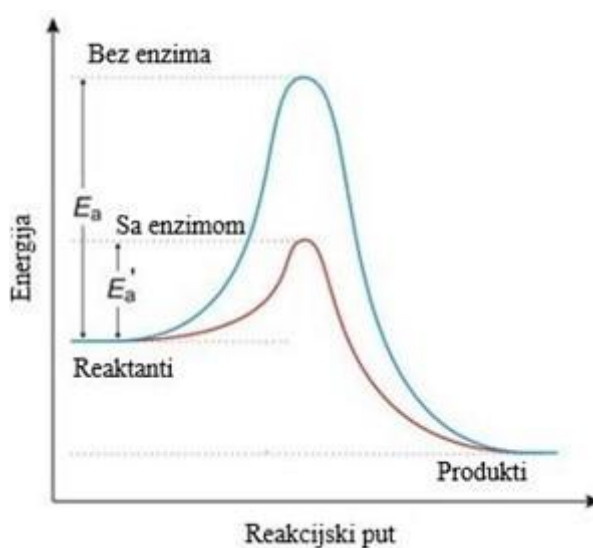
Drugi model, model pobuđene prilagodbe, kojeg je predložio Daniel Koshland 1958. godine, poboljšava ovu ideju uzevši u obzir dinamičnost enzima i supstrata. Ova teorija tvrdi da je aktivno mjesto enzima fleksibilno i modificira se prema obliku supstrata pri vezanju, što omogućuje optimalno pozicioniranje supstrata i katalitičkih grupa, stabilizirajući prijelazno stanje i smanjujući energiju aktivacije.<sup>40</sup>



Slika 12. Mehanizam djelovanja enzima na supstrat<sup>41</sup>

#### 2.4.4. Kinetika biokatalitičkih reakcija

Brzina reakcije postignuta djelovanjem enzima mjera je za enzimsku aktivnost. Biokatalizatori utječu na brzinu reakcije tako što reakciju provode po reakcijskom putu na kojem je niža energija aktivacije potrebna za prijelaz reaktanata u produkte te na taj način ubrzavaju reakciju.<sup>39</sup> U prisutnosti enzima, snižavanje energije aktivacije događa se povezivanjem supstrata i enzima u već spomenuti međukompleks, koji se zatim vrlo brzo raspada na nepromijenjeni enzim i produkte reakcije. Taj enzim odmah se može vezati na drugu molekulu supstrata. Na slici 13 prikazan je reakcijski put uz prisutnost enzima.<sup>42</sup>



Slika 13. Prikaz reakcijskog puta uz prisutnost enzima<sup>43</sup>

### 2.4.5. Klasifikacija enzima

Najčešća podjela enzima je prema vrsti reakcije koju kataliziraju.<sup>44</sup> Takav način podjele obuhvaća 6 osnovnih skupina enzima i prikazan je u tablici 1.

**Tablica 1.** Klasifikacija enzima<sup>44,45,46</sup>

Naziv skupine enzima	Primjer enzima	Vrsta reakcije
Oksidoreduktaze	Peroksidaze, lakaze, tirozinaze, glukoza oksidaze	Oksidacija-redukcija (redoks reakcije)
Hidrolaze	Glikozidaze, lipaze, proteaze, peptidaze	Hidroliza spojeva
Transferaze	Fosforilaze, glikoziltransferaze, aciltransferaze	Prijenos funkcionalnih skupina
Liaze	Dekarboksilaze, aldolaze, dehidrataze	Cijepanje različitih spojeva oksidacijom i hidrolizom
Ligaze	Karboksilaze, sintetaze	Spajanje dviju molekula kovalentnom vezom
Izomeraze	Racemaze, epimeraze, mutaze	Izomerizacija
Translokaze	ATPaze, ABC transporteri, proton pumpe	Prijenos iona i malih molekula s jedne strane membrane na drugu

### 2.4.6. Prednosti i nedostaci biokatalizatora

Enzimske reakcije sve se više koriste prije klasičnih kemijskih reakcija jer se provode pri blagim uvjetima temperature, tlaka i pH vrijednosti te s ekološkog stajališta, prihvatljivije su za okoliš jer enzimi nastaju iz obnovljivih izvora, biorazgradivi su te stvaraju male količine otpada.<sup>47</sup> Jedno od najbitnijih svojstava biokatalizatora jest njihova specifičnost koja se očituje u reakcijama s određenim supstratima te se zbog nje dobivaju produkti visokog stupnja čistoće. Troškovi prilikom pročišćavanja tih produkata su mali, ali su općenito enzimi kao biokatalizatori relativno skupi.<sup>48</sup> Također, jedan od nedostataka enzima jest njihova

nestabilnost izvan svog okruženja ili ovisnost o kofaktoru. Nadalje, ponekad dolazi i do inhibicije njihove aktivnosti supstratom ili produktima reakcije što znatno utječe na učinkovitost cijelog procesa.<sup>49</sup>

## 2.5. Enzimska sinteza galaktooligosaharida

Kada govorimo o enzimskoj sintezi galaktooligosaharida, koristimo enzime koji razgrađuju laktozu (disaharid koji se sastoji od glukoze i galaktoze) i potom kataliziraju prijenos galaktoznih jedinica na različite akceptorske molekule, formirajući tako galaktooligosaharide.<sup>27</sup>

Enzim koji se najčešće koristi za sintezu galaktooligosaharida je upravo  $\beta$ -galaktozidaza. Ovaj se enzim može izolirati iz različitih mikroorganizama, kao što su bakterije i gljive.<sup>50</sup> Na primjer,  $\beta$ -galaktozidaza iz *Aspergillus oryzae* (vrsta gljivice koja se često koristi u fermentaciji hrane i pića) pokazuje visoku aktivnost pri temperaturama od 30 do 40 °C i pH vrijednostima u rasponu 6-7.<sup>51</sup> Ovaj enzim ima široku primjenu zbog svoje stabilnosti i efikasnosti u sintezi GOS-a. Jedna od glavnih prednosti korištenja enzima  $\beta$ -galaktozidaze jest njegova visoka specifičnost prema supstratu i djelotvornost pri umjerenim temperaturama. Međutim, ima i nedostataka kao što su osjetljivost na pH promjene i moguća inhibicija produktima reakcije.<sup>52</sup>

$\beta$ -galaktozidaza kao enzim privukla je veliku pažnju s obzirom na pojavu intolerancije na laktozu u ljudskoj populaciji i zbog važnosti mlijeka u ljudskoj prehrani. Ona hidrolizira  $\beta$ -galaktopiranozide, odnosno laktozu, što povećava stabilnost mlijeka i koristi se za dobivanje mlijeka bez laktoze koje koriste osobe netolerantne na laktozu.<sup>53</sup> Također tvori niz produkata transgalaktozilacije - galaktooligosaharide (GOS) koji mogu pružiti nekoliko zdravstvenih prednosti kao prebiotici. Osim toga, enzim se također primjenjuje u proizvodnji zaslađivača na bazi laktoze i funkcionalnih proteina iz hidrolizirane sirutke.<sup>54</sup> Trenutno je uglavnom enzim dobiven iz mikrobni izvora poput *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces lactis*, oni su otporni na toplinu, s optimalnim pH između 4,0 i 6,0 uz nisku kemijsku otpornost.<sup>55</sup>

Najveća količina galaktooligosaharida postiže se korištenjem otopine laktoze, no sve se više istražuju i alternativni izvori njihove proizvodnje kao što su mliječni nusproizvodi poput slatke i kisele sirutke te njihovi odgovarajući permeati. Najvažniji čimbenici koji utječu na prinos GOS-a smatraju se podrijetlo enzima i početna koncentracija laktoze.<sup>56</sup> Također, pokazalo se da kationi prisutni u mlijeku i sirutki (npr. natrij, kalij, magnezij, kalcij) imaju

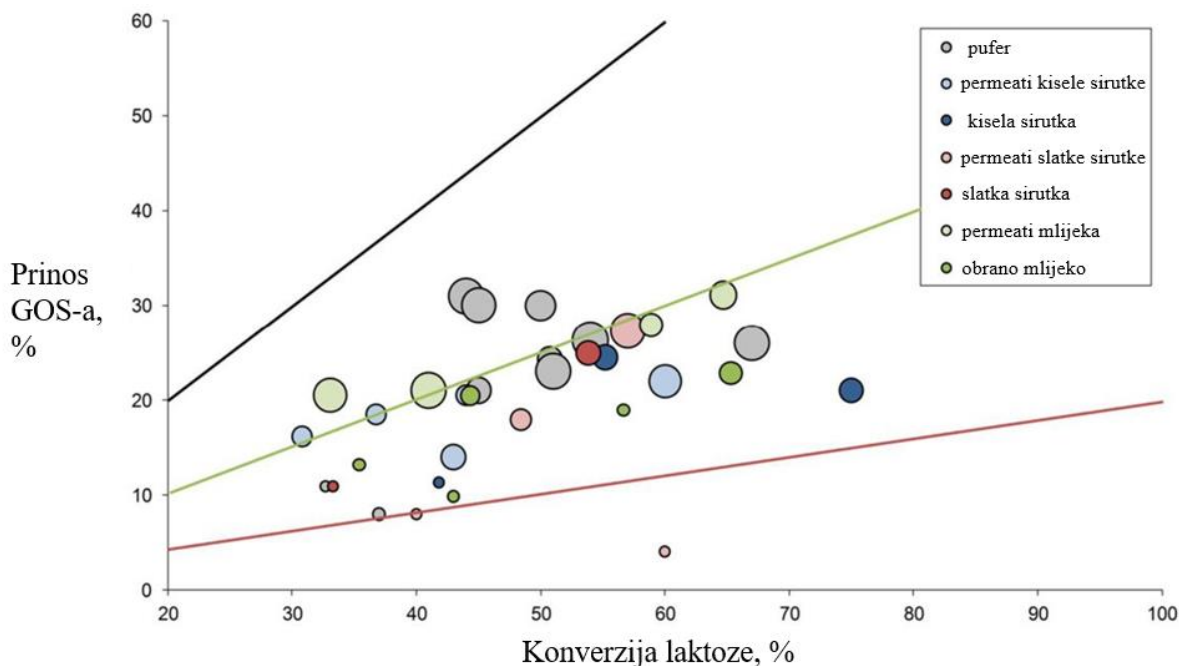
različite učinke na aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze. Većina studija pokazuje da natrij, kalij i magnezij djeluju kao aktivatori, dok kalcij smanjuje aktivnost enzima.<sup>57</sup>

Podrijetlo enzima definira sposobnost enzima i sklonost transgalaktozilaciji, tj. prijenosu dijela galaktoze na drugu molekulu šećera i veličinu inhibicije monosaharida. Početna koncentracija laktoze povećava mogućnost da akceptorska molekula bude laktoza, a ne voda, što bi dovelo do hidrolize.<sup>56</sup> Međutim, sam GOS također može djelovati kao molekula supstrata i stoga se ponovno hidrolizira tijekom reakcije.<sup>58</sup> Stoga je važno pravilno odabrati koncentraciju enzima i vrijeme reakcije kako bi se dobio najveći mogući prinos GOS-a (količina galaktooligosaharida koja se proizvede tijekom reakcije sinteze). Osim toga, uvjeti reakcije poput temperature i pH moraju biti u rasponu gdje je enzim  $\beta$ -galaktozidaza aktivan i dovoljno stabilan.<sup>55</sup>

Enzimi koji su najviše proučavani zbog njihove sposobnosti proizvodnje GOS u mlijeku ili sirutki su iz *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* i *Bacillus circulans*, te su navedeni enzimi komercijalno dostupni. Također, testirani su i enzimi iz raznih *Lactobacillus* vrsta, kao i neki iz *Streptococcus thermophilus* sojeva i nekoliko drugih mikroorganizama.<sup>59</sup>

Na slici 14 prikazani su prinosi GOS-a postignuti primjenom enzima  $\beta$ -galaktozidaze porijeklom iz *Aspergillus oryzae* u različitim medijima; u puferu, kiseloj i slatkoj sirutki, obranom mlijeku i njihovim permeatima (mediji prikazani mjehurićima na grafu).<sup>60</sup> Veličina mjehurića predstavlja početnu koncentraciju laktoze koja se nalazi u određenom mediju, stoga je iz slike 14 vidljivo da manji mjehurići, odnosno mediji s nižom početnom koncentracijom laktoze daju manji prinos galaktooligosaharida. Linije predstavljaju afinitet za transgalaktozilaciju izraženu kao postotak laktoze pretvorene u GOS.<sup>59,60</sup> (crna linija: 100%, zelena: 50% i crvena: 20%)

Ukupna sposobnost transgalaktozilacije u rasponu je sa srednjim omjerom GOS/reagirana laktoza od 0,4. Proučavani raspon pH je prilično uzak (pH 4,3 do 5,0) zbog optimalne aktivnosti ovih enzima u kiseloj sredini.<sup>61</sup>



**Slika 14.** GOS prinos dobiven primjenom  $\beta$ -galaktozidaze iz *Aspergillus oryzae* kao funkcija konverzije laktoze pri maksimalnom prinosu korištenjem različitih supstrata<sup>61</sup>

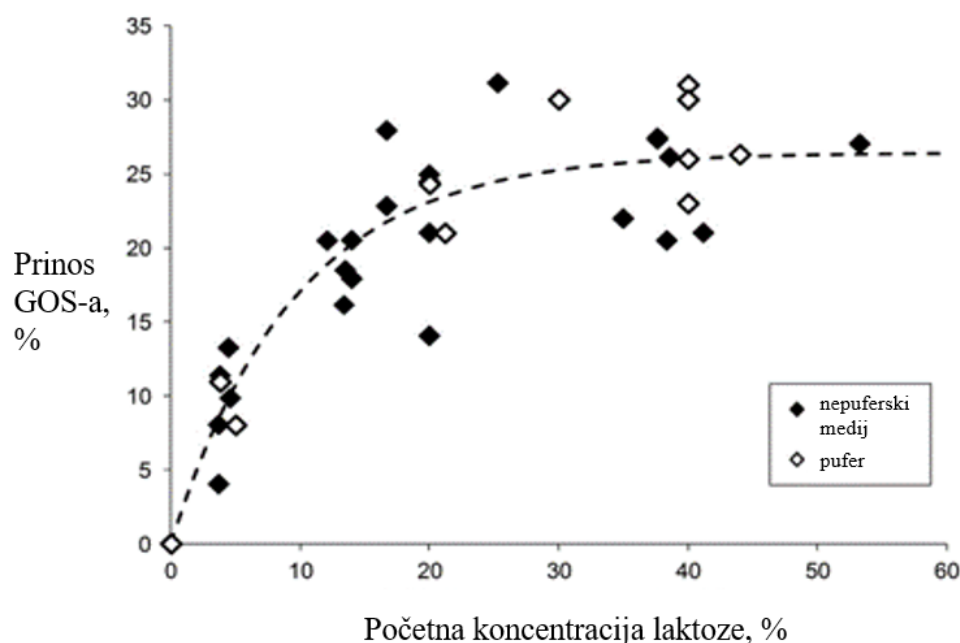
Prinos galaktooligosaharida također se može prikazati kao funkcija početne koncentracije laktoze.<sup>62</sup> Torres i suradnici prikazali su korelaciju između početne koncentracije laktoze i prinosa GOS-a koristeći podatke različitih autora i enzimskih izvora iz puferских otopina. Prilikom korištenja mliječnih supstrata poput mlijeka i sirutke nije pronađena jasna ovisnost za *B. circulans*, *K. lactis*, *Lactobacillus* sp. niti za *S. thermophilus*. Samo enzim iz *A. oryzae* pokazao je određenu korelaciju između početne koncentracije laktoze i prinosa GOS-a, neovisno o tome je li medij bio pufer ili neka mliječna tekućina (vidi sliku 15).<sup>27</sup>

Tako prilikom istraživanja, Torres i suradnici (2010.) uočili su da pri niskim vrijednostima početne koncentracije laktoze, blagi porast koncentracije laktoze rezultirao je značajnim povećanjem u prinosu galaktooligosaharida. Međutim, pri višim koncentracijama laktoze od 30% ili više, primijetili su da postoji zasićenje, što je ukazalo na ograničenje maksimalno ostvarivog prinosa GOS-a.<sup>27</sup> Ova je korelacija bila opisana jednostavnom eksponencijalnom jednadžbom zasićenja (jednadžba 1) koja omogućuje izračunavanje najvećeg prinosa GOS-a koji se može dobiti.<sup>59</sup>



$$Y = Y_{max} * (1 - \exp(-k * X)) \quad (1)$$

Korištenjem metode najmanjih kvadrata maksimalni prinos galaktooligosaharida ( $Y_{max}$ ) je izračunat na 26,5%, što je blizu maksimalne vrijednosti od 30%, dok  $k$  iznosi 0,104.<sup>59</sup>

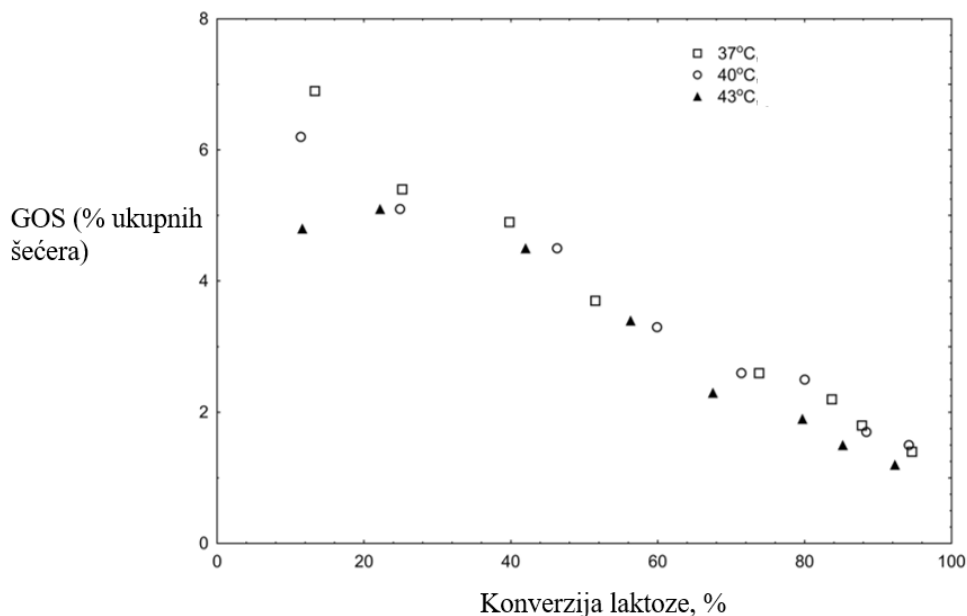


**Slika 15.** Korelacija između početne koncentracije laktoze i prinosa GOS-a dobivenog  $\beta$ -galaktozidazom iz *Aspergillus oryzae* u puferu ili nepuferskom mediju (sirutka, permeat sirutke, mlijeko, permeat mlijeka)<sup>59</sup>

Poznato je da se galaktooligosaharidi dobivaju iz laktoze, mliječnog disaharida, enzimskim procesima. Glavni izvor laktoze je mlijeko, a sve su popularnija istraživanja kozjeg mlijeka kao odličnog izvora laktoze zbog svojih nutritivnih prednosti u odnosu na kravlje mlijeko.<sup>63</sup> Kombinacijom enzimskih reakcija i membranskih procesa separacije poput mikrofiltracije (MF) i ultrafiltracije (UF) omogućena je učinkovita obrada kozjeg mlijeka i

njegovog permeata za proizvodnju GOS-a. Mikrofiltracijom i ultrafiltracijom uklanjaju se bakterije i masti iz mlijeka te se dobiva permeat s većom koncentracijom laktoze što je korisno za stvaranje GOS-a enzimskim reakcijama.<sup>64</sup>

Kaczynski i suradnici (2019.) proveli su istraživanje čiji je glavni cilj bila analiza stvaranja GOS-a u smjesi kozjeg mlijeka i njegovog permeata koja se temeljila na istovremenoj hidrolizi i transgalaktozilaciji laktoze koristeći  $\beta$ -galaktozidazu iz *Kluyveromyces lactis* pri različitim temperaturnim i vremenskim uvjetima. Dobivena smjesa koristit će se kao sirovina za proizvodnju inovativnog kefiru putem mliječno-alkoholne fermentacije.<sup>65</sup> Korišteno kozje mlijeko i permeat dobiven mikrofiltracijom (MF) i ultrafiltracijom (UF) kombinirani su u omjeru 60:40. Reakciju je katalizirala  $\beta$ -galaktozidaza iz *Kluyveromyces lactis* dodana u koncentraciji od 0,1%. Istodobna hidroliza i transgalaktozilacija laktoze provedene su pri temperaturama od 37, 40 i 43 °C tijekom 6 sati. Uzorci su zatim pasterizirani pri 92 °C tijekom 15 min da bi se postigla inaktivacija enzima.<sup>64</sup>



**Slika 16.** Proizvodnja GOS-a u smjesi kozjeg mlijeka i permeata (60:40) pri različitim temperaturama<sup>64</sup>

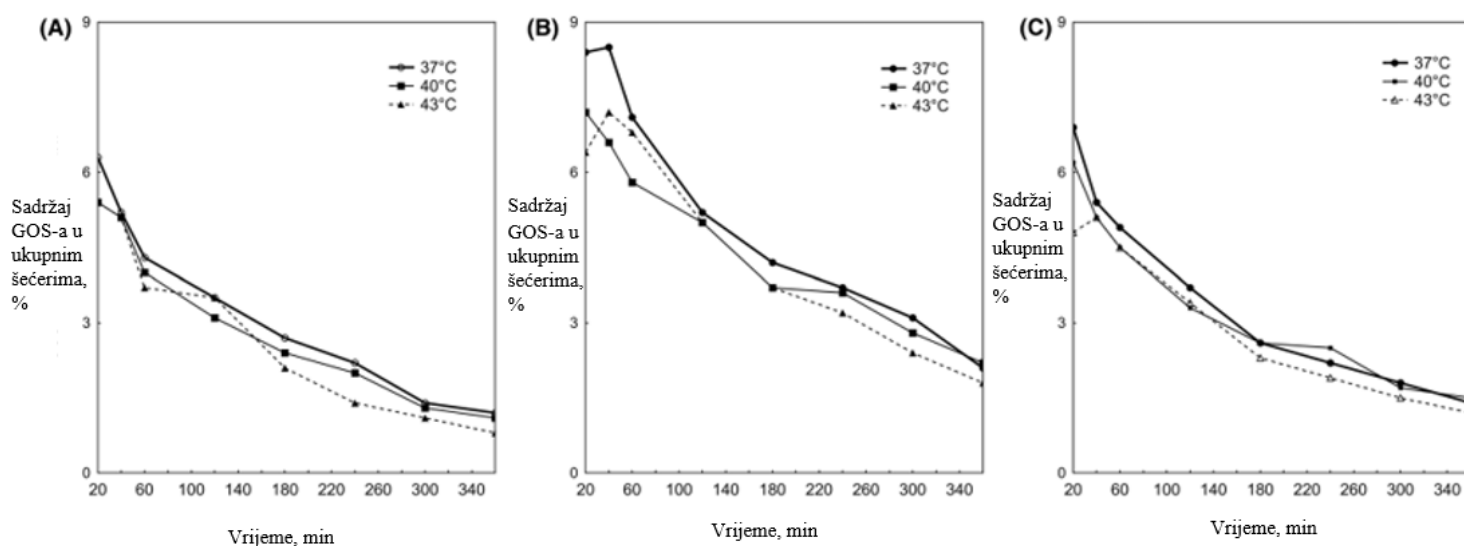
Iz slike 16 vidimo da je optimalan uvjet za sintezu galaktooligosaharida temperatura od 37 °C budući da je pri toj temperaturi (označena kvadratićem na grafu) zapažena najveća količina proizvedenog galaktooligosaharida.

Nakon enzimskih reakcija hidrolize i transgalaktolizacije, pasterizirano mlijeko, permeat te njihova mješavina fermentirani su u procesu lakto-alkoholne fermentacije korištenjem mješavina mezofilnih sojeva bakterija mliječne kiseline i kvasca. Fermentacija je provedena pri 22 °C. Količina dodanih kultura odabrana je na način da završna točka fermentacije bude proizvod s pH vrijednosti od 4,4.<sup>64</sup>

Sastav GOS-a određen je koristeći tekućinsku kromatografiju i masenu spektrometriju za detekciju galaktoze, glukoze i laktoze.<sup>66</sup> Stupanj hidrolize laktoze (DLH) računao se preko formule (jednadžba 2) za koju su također bile mjerene rezidualna (preostala) koncentracija laktoze (RL) i početna koncentracija laktoze (IL) u g/kg.<sup>67</sup>

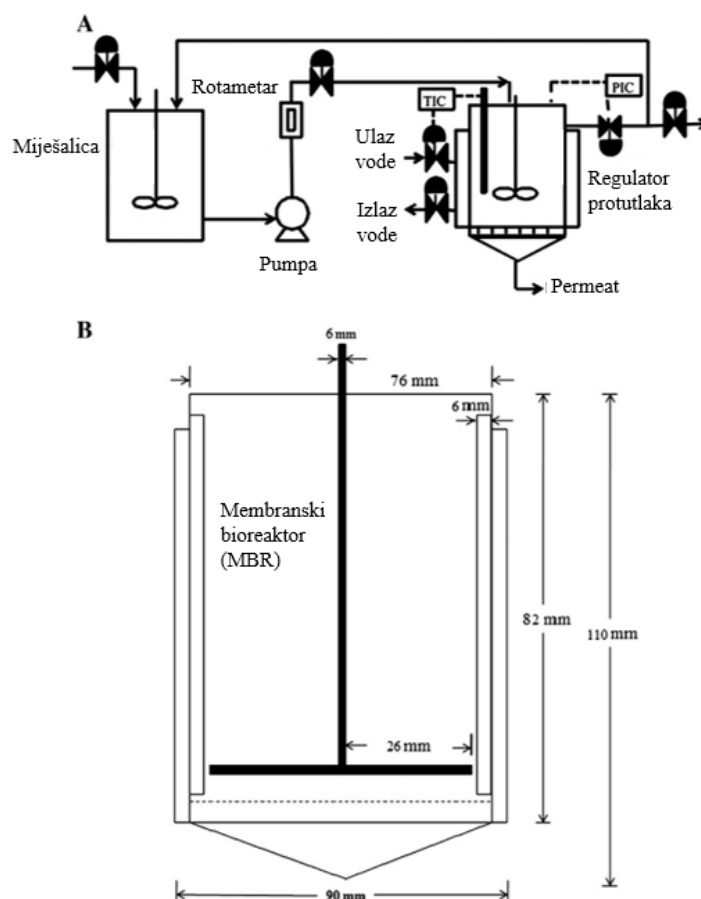
$$DLH = \left( 1 - \frac{RL}{IL} \right) * 100\% \quad (2)$$

Rezultati provedenog istraživanja (slika 17) pokazali su da je količina GOS-a proizvedena u permeatu (slika B) bila veća nego u kozjem mlijeku (A). Najveće količine GOS-a u smjesi zabilježene su tijekom prvog sata reakcije i to u prvih 20 minuta pri temperaturi od 37 °C. Nakon 20 minuta, sadržaj GOS-a u mješavini mlijeka i permeata iznosio je u prosjeku  $5,9 \pm 0,9$  % ukupnih šećera, dok je nakon 6 sati reakcije prosječno iznosio  $1,4 \pm 0,1$  % ukupnih šećera.<sup>64</sup>



**Slika 17.** Kinetika sinteze GOS-a enzimskim reakcijama laktoze u: A) kozjem mlijeku, B) permeatu i C) njihovoj smjesi omjera 60:40<sup>64</sup>

Galaktooligosaharide možemo sintetizirati i izdvojiti pomoću membranskog bioreaktora (MBR) (slika 18). Reaktor koji povezuje svojstava membrana s biološkim katalizatorom kao što su enzimi, naziva se membranski bioreaktor (MBR). Takav bioreaktor nalazi svoju primjenu širom svijeta, kako u istraživanju tako i u proizvodnji.<sup>68</sup> U membranskom bioreaktoru se istovremenom reakcijom i odvajanjem produkta potiče željena reakcija i smanjuje vrijeme obrade. Općenito, MBR djeluje na princip da su enzimi imobilizirani na matrici membrane gdje supstrati imaju izravan kontakt s njima, a molekule proizvoda se transportiraju kroz porozne kanale membrane.<sup>69</sup> Iako je mali nedostatak MBR-a koncentracijska polarizacija i niska učinkovitost pretvorbe, njegove prednosti u odnosu na bioreaktore s pakiranim slojem i biokemijske reakcije slobodnih enzima su bolja uporaba proizvoda, efikasnije heterogene reakcije i mogućnost ponovne upotrebe enzima.<sup>70</sup>

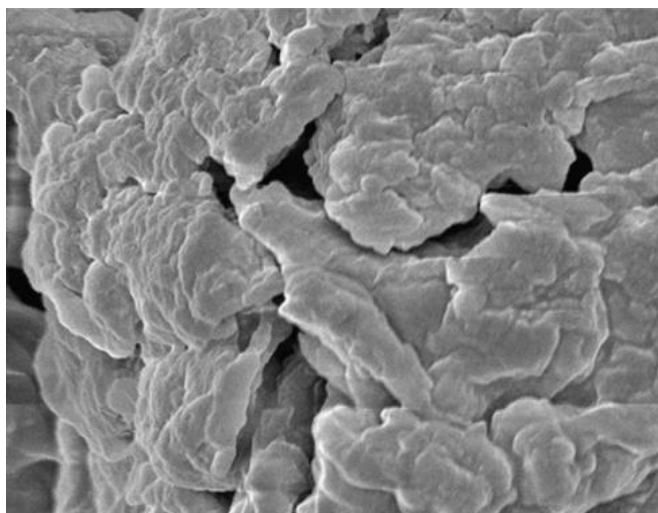


**Slika 18.** Shema procesa sinteze i izdvajanja galaktooligosaharida pomoću membranskog bioreaktora (MBR)<sup>71</sup>

Nadalje, zbog mogućnosti odvajanja produkata i molekula reaktanata, reverzibilne reakcije se uvijek lakše provode u ovoj vrsti reaktora.<sup>71</sup> Na djelotvornost MBR-a značajno utječu radni uvjeti (transmembranski pritisak/tlak (TMP), brzina protoka hranjive otopine, brzina miješalice), fizikalna svojstva membrane (poroznost, debljina membrane i materijal membrane), imobilizacija enzima (pH, kemikalija za umrežavanje) i uvjeti reakcije katalize (optimalni pH i temperatura).<sup>69</sup>

Provedeno je istraživanje u kojemu su Nath i suradnici (2013.) usmjerili glavni fokus na imobilizaciju enzima  $\beta$ -galaktozidaze na površini membrane (slika 19) koja je zatim korištena u membranskom bioreaktoru za hidrolizu laktoze i samim time i sintezu GOS-a.<sup>71</sup>

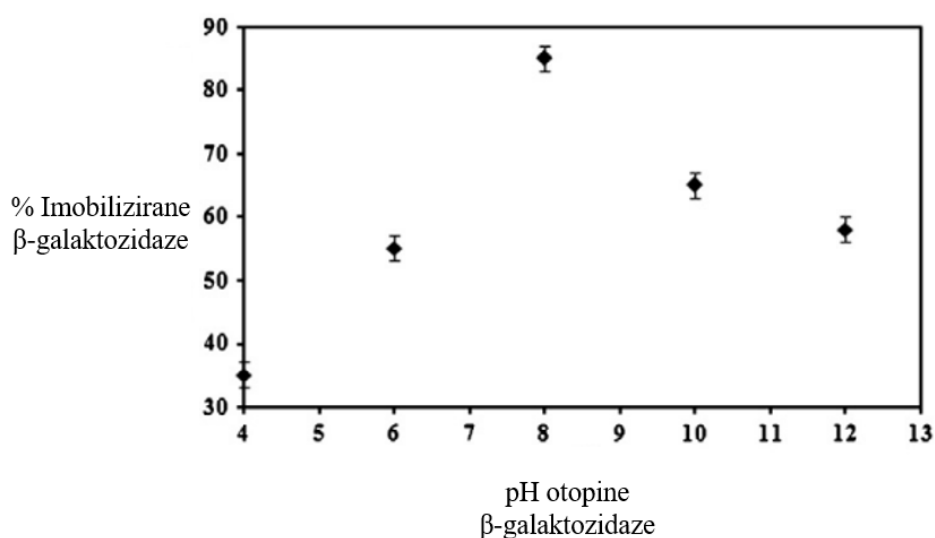
$\beta$ -galaktozidaza imobilizirana je na površini membrane kombinacijom nekoliko mehanizama, uključujući adsorpciju polietilenimina (PEI) na matricu membrane, formiranje PEI i  $\beta$ -galaktozidaze agregata, te konačno umrežavanje PEI i  $\beta$ -galaktozidaze kompleksa na membranskoj površini pomoću glutaraldehida.<sup>72</sup> Optimalni uvjeti za imobilizaciju uključuju pH 8.2 za agregaciju PEI-enzim i pH 7.0 za umrežavanje PEI-enzim kompleksa, s omjerom PEI prema  $\beta$ -galaktozidazi 1:25.<sup>71,72</sup>



**Slika 19.** Mikroskopska slika imobilizacije  $\beta$ -galaktozidaze na površini membrane<sup>71</sup>

Galaktooligosaharidi sintetizirani su istovremenom hidrolizom laktoze kao reakcije transgalaktozilacije u MBR s recirkulacijom retentata uz laktozu kao supstrat. Glukoza i galaktoza, proizvodi reakcije hidrolize laktoze, uklonjeni su s membranske strane permeata da bi potaknuli reakcije transgalaktozilacije.<sup>73</sup> Različiti radni uvjeti unutar MBR-a bili su ispitani

pri konstantnom pH kako bi se smanjio nepoželjan efekt koncentracijske polarizacije. Optimalni pH koji se u istraživanju koristio za sintezu GOS-a bio je onaj pH kod kojeg je postignuta maksimalna imobilizacija  $\beta$ -galaktozidaze na površini membrane i iznosio je 8.2. Pri toj vrijednosti uočeno je da je čak 85%  $\beta$ -galaktozidaze imobilizirano na površini membrane, što je vidljivo i na slici 20. Također, ovim istraživanjem dobiveno je da su optimalni uvjeti za sintezu GOS-a: početna koncentracija supstrata (laktoze) 0.045 M, brzina protoka hranjive otopine 25 mL/h, temperatura pri 45 °C, transmembranski pritisak (TMP) 3.0 kgf cm<sup>-2</sup> te brzina miješanja 80 okr min<sup>-1</sup>. Sintetizirani GOS prikupljen je iz spremnika za hranu kao smjesa ugljikohidrata nakon što je postignuta stabilizacija protoka permeata.<sup>71</sup>



**Slika 20.** % Imobilizirane  $\beta$ -galaktozidaze na površini membrane pri različitim pH vrijednostima otopine  $\beta$ -galaktozidaze<sup>71</sup>

## 2.6. Primjena galaktooligosaharida

Galaktooligosaharidi, kao skupina prebiotičkih ugljikohidrata nalaze mnoge primjene prvenstveno u prehrambenoj industriji. Prirodno ih nalazimo u mlijeku i mliječnim proizvodima, stoga je poželjno da majčino mlijeko bude što duže glavni oblik prehrane novorođenčadi.<sup>74</sup> GOS se često dodaje u formule za dojenčad kako bi simulirao učinak majčinog mlijeka što pomaže u poticanju rasta zdravih cijevnih bakterija i održavanju njihove zdrave crijevne mikrobiote. Zbog svoje stabilnosti, osim u hrani za dojenčad, galaktooligosaharidi se mogu također uključiti u širok spektar druge hrane.<sup>75</sup> Odnedavno se koriste u pićima (voćni sokovi i druga kisela pića), kao zamjena za obroke, u fermentiranom mlijeku, aromatiziranom mlijeku i konditorskim proizvodima (bombonski i čokoladni proizvodi).<sup>76</sup>

Galaktooligosaharidi nerijetko su ugrađeni u kruh i ostale pekarske proizvode jer se njegove molekule prilikom procesa fermentacije i pečenja pekarskih proizvoda ne cijepaju niti troše. Također, GOS daje bolji okus i teksturu kruhu jer posjeduje visoku sposobnost zadržavanja vlage čime se sprječava prekomjerno sušenje proizvoda. Primjenjuje se i u specijaliziranoj hrani za starije i hospitalizirane osobe.<sup>77</sup>

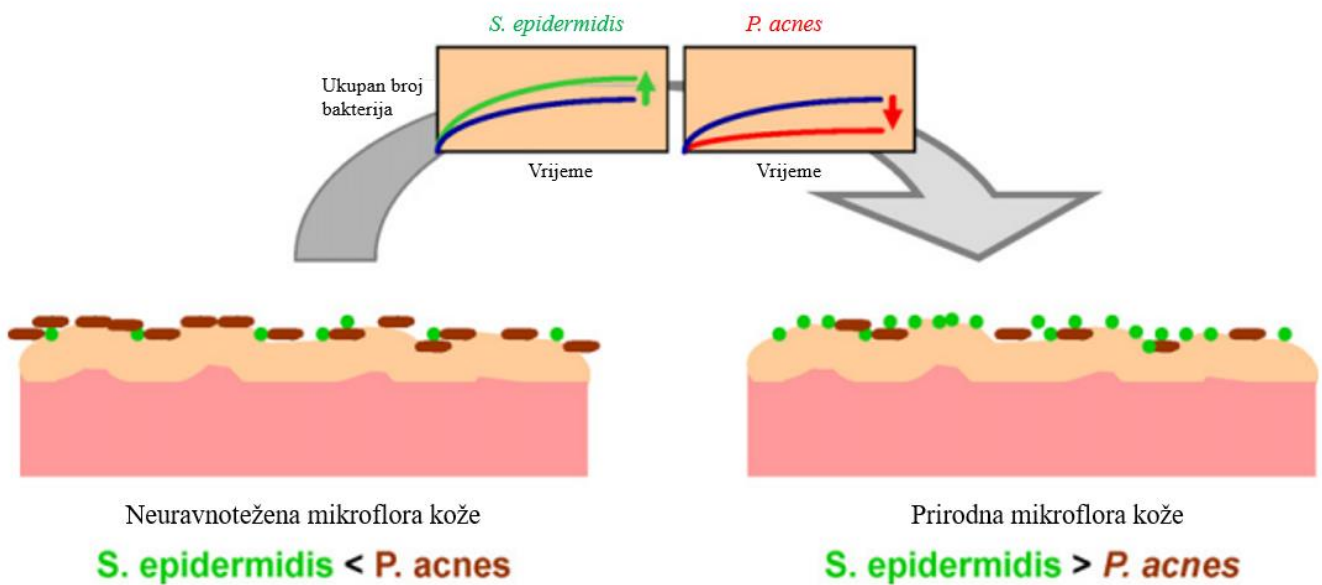
Osim kruhu, galaktooligosaharidi daju bolji okus i poboljšavaju teksturu ostale hrane zbog njihovog svojstva povećanja volumena kao što to postižu i drugi oligosaharidi. Otporni su na razgradnju putem slin i oralnih bakterija, stoga se mogu koristiti kao zamjene za šećer. Njihovo svojstvo neprobavljivosti omogućuje im zanemariv utjecaj na glukozu u krvi.<sup>78</sup>

Pored prehrambene industrije, GOS se koristi i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Njegova fizikalno-kemijska i fiziološka svojstva koriste mu za selektivno stimuliranje korisnih bakterija na ljudskoj koži i već su razvijene neke formulacije u tu svrhu.<sup>79</sup>

Sastav mikroflore kože ovisi o mnogim čimbenicima i ravnoteža bakterija može se lako poremetiti. Provedeno je istraživanje na primjeru kože osobe koja pati od akni, gdje je primijećeno prekomjerno razmnožavanje bakterije *P. acnes*.<sup>80</sup> Kod uobičajenih kozmetičkih strategija, ovaj problem bi se riješio korištenjem antibakterijskih sredstava koja učinkovito smanjuju količine *P. acnes*, ali ta sredstva također utječu i na druge, korisne bakterije poput *S. epidermidis*, inhibirajući njihov rast. Ta bakterija nam je potrebna jer pruža zaštitu ljudskoj koži od infekcija i drugih štetnih utjecaja iz okoline. Iz tog razloga, proučavana je prebiotička strategija koja se temelji na uspostavi ravnoteže mikroflore na način da inhibira rast bakterije

*P. acnes*, ali da ne prekida rast korisnih bakterija. Prirodna (uravnotežena) kožna mikroflora postignuta primjenom prebiotika vidljiva je na slici 21.<sup>81</sup>

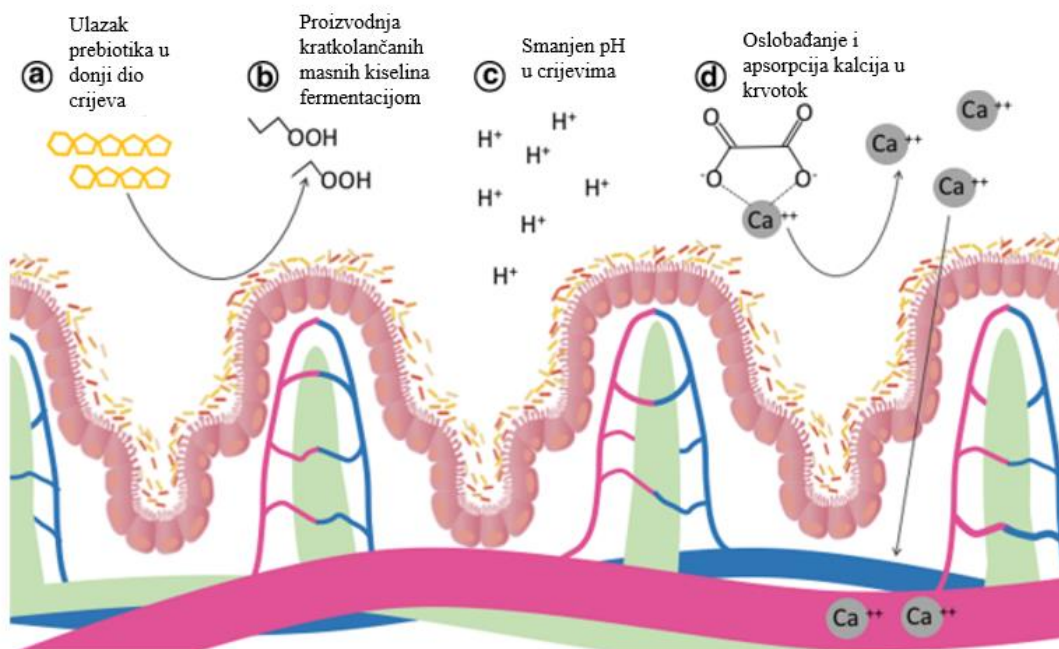
U tom istraživanju mikroflora kože analizirana je metodom fluorescentne in situ hibridizacije koja omogućava izravno promatranje bakterija na koži.<sup>82</sup> Primijećeno je da dvostruka dnevna primjena kozmetičkog proizvoda koji sadrži odabrane biljne ekstrakte iz ginsenga, crnog ribiza ili bora na ljudsku kožu tijekom tri tjedna učinkovito inhibira rast patogenih bakterija *P. acnes*, a pritom čuva ili čak potiče rast korisnih bakterija *S. epidermidis*. Takav prebiotički pristup rješavanju problema akni pokazao se uspješnijim od antibakterijskih kozmetičkih proizvoda koji neselektivno smanjuju rast bakterija pomoću antibiotika.<sup>83</sup>



**Slika 21.** Primjena prebiotičkog pristupa u uspostavljanju ravnoteže mikroflora kože<sup>81</sup>



Poznate su zdravstvene prednosti galaktooligosaharida u očuvanju zdravlja crijeva poboljšanjem ravnoteže crijevne mikrobiote na način da se potiče rast korisnih bakterija kao što su bifidobakterije i laktobacili. Osim zdravlja crijeva, postoje neka istraživanja koja ukazuju na povoljne učinke GOS-a na zdravlje kostiju, povećavajući apsorpciju minerala poput kalcija u donjem dijelu crijeva.<sup>84</sup> Kako postoji malo podataka za ljude, ključni su bili modeli na životinjama za proučavanje utjecaja prebiotika na gustoću mineralnih tvari u kostima (slika 22). Za poboljšanu apsorpciju minerala kalcija i zdravlje kostiju provodili su se procesi mikrobne fermentacije i hidrolize za proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina u donjem dijelu crijeva. Ovi procesi doveli su do smanjenja pH vrijednosti u crijevima.<sup>85</sup> Veća kiselost u debelom crijevu sprječavala je stvaranje kompleksa kalcija s negativno nabijenim metabolitima, što je rezultiralo oslobađanjem kalcija iz molekula metabolita te se na taj način povećala njegova dostupnost za apsorpciju u krvotok i kasnije mineralizaciju kostiju.<sup>86</sup>



**Slika 22.** Prebiotički učinak na povećanu apsorpciju kalcija<sup>85</sup>

### 3. ZAKLJUČAK

Galaktooligosaharidi spojevi su građeni od nekoliko molekula galaktoze vezanih na glukozu pomoću glikozidnih veza. Prirodno ih nalazimo u majčinom mlijeku i pokazali su vrlo pozitivne učinke na probavni sustav jer potiču rast korisnih bakterija poput bifidobakterija i laktobacila. Zbog svojih svojstava ubrajamo ih u skupinu prebiotika za čiju pripadnost trebaju biti ispunjeni kriteriji koji se odnose se na otpornost na želučanu kiselinu, na hidrolizu enzimima i na probavnu apsorpciju, fermentaciju pomoću crijevne mikroflore i selektivnu stimulaciju rasta i/ili aktivnosti onih crijevnih bakterija (bifidobakterija i laktobacila) koje pridonose zdravlju i dobrobiti. Koncept prebiotika privukao je veliku pozornost, što za znanstvene, što za industrijske interese. Biološki su nam važni zbog svoje sigurnosti i stabilnosti te njihovog svojstva visoke topljivosti čistog okusa pa se nerijetko koriste kao dodaci hrani. GOS može poboljšati izgled, okus, teksturu, rok trajanja i zdravstvene prednosti prehrambenih proizvoda.

Sintetiziraju se enzimskim procesima, u kojima se supstrat, uglavnom laktoza, razgrađuje na monomerne galaktozne jedinice pomoću enzima  $\beta$ -galaktozidaze. Ovaj se enzim može izolirati iz različitih mikroorganizama, kao što su bakterije i gljive, a prednosti njegova korištenja su visoka specifičnost prema supstratu i djelotvornost pri umjerenim temperaturama. Jedan od glavnih izvora laktoze jest mlijeko, posebice kozje mlijeko zbog svojih nutritivnih vrijednosti. Osim laktoze, sve se više istražuju i alternativni izvori njihove proizvodnje kao što su mliječni nusproizvodi poput slatke i kisele sirutke te njihovi odgovarajući permeati. Smjesa kozjeg mlijeka i njegova permeata koristi se kao sirovina za proizvodnju inovativnog kefira putem mliječno-alkoholne fermentacije, a hidrolizom i transgalaktozilacijom laktoze iz te smjese koristeći  $\beta$ -galaktozidazu možemo dobiti galaktooligosaharide. Također, galaktooligosaharide možemo sintetizirati i separirati pomoću membranskog bioreaktora, za što je najbitnije da je enzim imobiliziran na površini membrane gdje supstrat, laktoza, ima izravan kontakt s enzimom te se na taj način njena hidroliza može brže odvijati.

Galaktooligosaharidi, zbog svojih prebiotičkih svojstava, svoju primjenu ponajviše pronalaze u prehrambenoj industriji gdje ih osim u mlijeku pronalazimo i u pićima, kruhu, konditorskim proizvodima. Nadalje, važni su i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog svojih zdravstvenih prednosti na crijevnu mikrofloru, ljudsku kožu, imunološki sustav te na zdravlje kostiju.

U provedenim istraživanjima mikroflore kože pokazala se uspješnija prebiotička strategija koja se temelji na uspostavi ravnoteže mikroflore na način da inhibira rast štetne bakterije, ali da ne prekida rast korisnih bakterija. Također, primjena galaktooligosaharida u donjem dijelu crijeva rezultira smanjenim pH tog područja te se na taj način pospešuje apsorpcija kalcija u krvotok i mineralizacija kostiju što direktno utječe na zdravlje kostiju.

## 4. LITERATURA

1. Chaves e Souza, A. F., Gabardo, S., de Jesus Silva Coelho, R. (2022). Galactooligosaccharides: Physiological benefits, production strategies, and industrial application. *Journal of Biotechnology*, 359, 116-129.
2. Lamsal, B. P. (2012). Production, health aspects, and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Food Science and Technology International*, 18(2), 147-157.
3. Otieno, D. O. (2010). Synthesis of  $\beta$ -galactooligosaccharides from lactose using microbial  $\beta$ -galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 471-482.
4. Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121(2), 307–318.
5. Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
6. Scantlebury Manning, T., & Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 287-298.
7. Roberfroid, M. B. (1998). Prebiotics and synbiotics: Concepts and nutritional properties. *British Journal of Nutrition*, 80(1), 197-202.
8. Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J. A. E., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 257-259.
9. Macfarlane, G. T., Gibson, G. R., & Cummings, J. H. (1992). Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(1), 57-64.
10. Bouhnik, Y., Flourie, B., D'Agay-Abensour, L., Paineau, D., Bornet, F., & Rambaud, J. C. (1997). Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal *Bifidobacteria* and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 127(3), 444-448.

11. Roberfroid, M. B. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(2), 830-837.
12. Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., & Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(1), 1-28.
13. Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J. & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92.
14. Louis, P., Flint, H. J., & Michel, C. (2016). How to manipulate the microbiota: Prebiotics. In *Microbiota of the Human Body*, 119-142.
15. Stick V. R., Williams J.S., (2009). *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life (Second Edition)*
16. Macfarlane, G., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305-344.
17. Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch - Stärke*, 63(7), 406-415.
18. <https://www.nantekimya.com/en/product/346/polydextrose> (pristup 29.8.2024.)
19. Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G. R., Kwik-Urbe, C., & Spencer, J. P. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 62-72.
20. <https://www.tuscany-diet.net/wp-content/uploads/2014/01/Sottogruppi-di-flavonoidi.gif> (pristup 29.8.2024.)
21. Sangwan, V., Tomar, S.K., Singh, R.R.B., Singh, A.K, Ali, B. (2011). Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(2), 70-88.

22. Ackerman, D. L., Craft, K. M., & Townsend, S. D. (2017). Infant food applications of complex carbohydrates: Structure, synthesis, and function. *Carbohydrate Research*, 437, 16-27.
23. Rao, A. S., Nair, A., Salu, H. A., Pooja, K. R., Nandyal, N. A., Joshi, V. S., More, V. S., Francois, N., Anantharaju, K. S., & More, S. S. (2023). Carbohydrases: a class of all-pervasive industrial biocatalysts. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 497-523.
24. Goulash, A. K., Tzortzis, G., Gibson, G. R. (2007). Galacto-oligosaccharides: structure, function, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(2), 164-176.
25. Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M., Kuroshima, T., Ueyama, S., Matsumoto, K., Kuroda, A., & Mutai, M. (1983). Effects of administration of *Bifidobacterium breve* 4006 on the human flora. *Bifidobacteria and Microflora*, 2(1), 17-24.
26. Bakker-Zierikzee, A. M., Alles, M. S., Knol, J., Kok, F. J., Tolboom, J. J. M., & Bindels, J. G. (2005). Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life. *British Journal of Nutrition*, 94(5), 783-790.
27. Torres, D. P. M., Gonçalves, M. P. F., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 438-454.
28. von Ah, U., Mozzetti, V., Lacroix, C., Kheadr, E. E., Fliss, I., & Meile, L. (2007). Classification of a moderately oxygen-tolerant isolate from baby faeces as *Bifidobacterium thermophilum*. *BMC Microbiology*, 7
29. Sheveleva, S.A., Probiotics, prebiotics and probiotic products. Current status. *Voprosy Pitaniia*, (68) 32–40.
30. Eiwegger, T., Stahl, B., Schmitt, J., Boehm, G., Gerstmayr, M., Pichler, J., et al. (2004). Human milk-derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatric Research*, (56) 536–540.
31. Mei, Z., Yuan, J., & Li, D. (2022). Biological activity of galacto-oligosaccharides: A review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 993052.
32. Farthing, M. J. (2004). Bugs and the gut: An unstable marriage. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology* 18, 233–239.

33. Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449–458.
34. Wang, K., Duan, F., Sun, T., Zhang, Y., & Lu, L. (2023). Galactooligosaccharides: Synthesis, metabolism, bioactivities and food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.
35. Hranuelli F., Jakobović Z., Podlesnik V., Viličić F., *Tehnička enciklopedija* 5. dio, Zagreb, (1976), 334-345.
36. Nelson, D. L., Lehninger, A. L., Cox, M. M. (1993). *Principles of biochemistry*, Worth Publishers, New York, 198-205, 211-214.
37. Findrik Blažević, Z., (2017). *Bioreaktori*, Interna skripta za dio kolegije Reaktori i bioreaktori, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.
38. <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/levels-protein-structure-from-amino-acids-vector-27792992> (pristup 15.7.2024.)
39. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2003). *Biochemistry*, Fifth edition, W.H. Freeman and Company, New York, 189-195, 200-203.
40. Alberts, B., Koshland, D. (1920–2007). *Nature*, (448), 882-883.
41. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?search=enzyme+binding&title=Special:MediaSearch&go=Go&type=image> (pristup 20.7.2024.)
42. Bošković, M. i Podhorsky, R. (1976). ENZIMI, *Tehnička enciklopedija*, sv. 5, Zagreb, 334-345.
43. <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/enzyme-structure-and-catalysis/a/enzymes-and-the-active-site> (pristup 20.7.2024)
44. A. Illanes, *Enzyme Biocatalysis* (2008). Principles and Applications, Springer Verlag, 16-18.
45. de Keyzer, J., van der Does, C., Driessen, A. J. M. (2003). The bacterial translocase: A dynamic protein channel complex. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(10), 2034–2052.
46. Herrmann, J. M., Neupert, W. (2013). Protein Import into Mitochondria. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 632-636.

47. Shoda, S., Uyama H., Kadokawa J., Kimura S., Kobayashi, S., (2016). Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis, *Chemical Reviews*, 116, 2307-2413.
48. Johannes, T., Simurdiak, M. R., Zhao, H., (2006). Biocatalysis, *Encyclopedia of Chemical Processing*, Taylor & Francis, New York, 101-109.
49. Loughlin W. A., (2000). Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology*, 74, 49-62.
50. Oliveira, C., Guimaraes, P. M., & Domingues, L. (2011). Recombinant microbial systems for improved b-galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 600–609.
51. Carević, M., Ćorović, M., Mihailović, M., Banjanac, K., Milisavljević, A., Veličković, D., & Bezbradica, D. (2016). Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified b-galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. *International Dairy Journal*, 54,50–57.
52. Park, A. R., Oh, D. K. (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial b-galactosidase: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1279–1286.
53. Wilde, J., Baumgartner, C., Fertsch, B., Hinrichs, J. (2001). Matrix effects on the kinetics of lactose hydrolysis in fermented and acidified milk products. *Chemical Biochemical Engineering*, (15), 143–147.
54. Vasileva, N., Yavor, I., Stanka, D., Iliana, K., Tzonka, G. (2016). Hydrolysis of whey lactose by synthesis of galacto-oligosaccharides by b-galactosidase immobilized in a bioreactor with a spirally wound membrane. *International Journal of Biological Macromolecules*, (82), 339–346.
55. Xavier, J. R. (2018). Beta-galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *Journal of Food Biotechnology*, 32(4), 567-578.
56. Vera, C., Cordova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suarez, S., & Illanes, A. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: State of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1–20.



57. Flores, M. V., Ertola, R. J., Voget, C. E. (1996). Effect of monovalent cations on the stability and activity of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *Food Science and Technology*, 29, 503–506.
58. Lamsal, B. P. (2012). Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2020–2028.
59. Fischer, C., Kleinschmidt, T. (2018). Synthesis of galactooligosaccharides in milk and whey: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 678-689.
60. Albayrak, N., Yang, S. T. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 8–19.
61. Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A., Horiuchi, T. (1975). Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biochemistry*, 77, 241–247.
62. Rodriguez-Colinas, B., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., Plou, F. J. (2012). Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6391–6398.
63. Santibanez, L., Fernandez-Arroyo, L., Guerrero, C., Plou, F.J., Illanes A. (2016). Removal of lactose in crude galacto-oligosaccharides by  $\beta$  galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Molecular Catalysis*, (133) 85–91
64. Kaczyński, Ł. K., Cais-Sokolińska, D., Szwengiel, A. (2019). Kinetics of lactose hydrolysis and galactooligosaccharides formation in beverages based on goat's milk and its permeate. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1529-1534.
65. Cais-Sokolinska, D., Wojtowski, J., Pikul, J., Dankow, R., Majcher, M., Teichert, J., Bagnicka, E. (2015). Formation of volatile compounds in kefir made of goat and sheep milk with high polyunsaturated fatty acid content. *Journal of Dairy Science*, (98), 6692–6705.
66. Slegte, J. D. (2002). Determination of trans-galactooligosaccharides in selected food products by ion-exchange chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, (85), 417–423.

67. 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*, (63), 111–116.
68. Cicek, N. (2003). A review of membrane bioreactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater, *Canadian Biosystems Engineering*, (45), 6.37–6.49
69. Nakajima, M., Cardoso, J. P. (1989). Forced-flow bioreactor for sucrose inversion using ceramic membrane activated by silanization, *Biotechnology and Bioengineering*. (33), 856–861.
70. Jefferson, B., Laine, A. L., Judd, S., Stephenson, T. (2000). Membrane bioreactors and their role in wastewater reuse. *Water Science and Technology*, 41(1), 197–204.
71. Nath, A., Bhattacharjee, C., Chowdhury, R. (2013). Synthesis and separation of galacto-oligosaccharides using membrane bioreactor. *Desalination*, (316), 31-41.
72. Sen, D., Sarkar, A., Gosling, A., Gras, S. L., Stevens, G. W., Kentish, S. E., Bhattacharya, P. K., Barber, A. R., Bhattacharjee, C. (2011). Feasibility study of enzyme immobilization on polymeric membrane: A case study with enzymatically galacto-oligosaccharides production from lactose. *Journal of Membrane Science*, 378(1-2), 471–478.
73. Iwasaki, K. I., Nakajima, M., Nakao, S. I. (1996). Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using  $\beta$ -galactosidase. *Process Biochemistry*, 31(1), 69–76.
74. Dziezak, J. D. (1991). Enzymes: Catalysts for food processes. *Food Technology*, (45), 78–85.
75. Boehm, G., Fanaro, S., Jelinek, J., Stahl, B., Marini, A. (2003). Prebiotic concept for infant nutrition. *Acta Paediatrica*, 91(441), 64–67.
76. Affertsholt-Allen, T. (2007) Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives. Symposium “Lactose and its Derivatives.”
77. Sako, T., Matsumoto K., Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of nondigestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9(1), 69–80.
78. Prapulla, S. G., Subhadrada, V., Karanth, N. G. (2000). Microbial production of oligosaccharides: A review. *Advances in Applied Microbiology*, (47), 299–343.

79. Bockmuhl, D., Jassoy, C., Nieveler, S., Scholtyssek, R., Wadle, A., Waldmann-Laue, M. (2007). Prebiotic cosmetics: an alternative to antibacterial products. *International Journal of Cosmetic Science*, 29(1), 4–63.
80. Leyden, J. J., McGinley, K. J., Bowels, B. *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. *Dermatology* (998), 55–58.
81. Krutmann, J. (2009). Pre- and probiotics for human skin. *Journal of Dermatological Science*, 54(1), 1–5.
82. Harmesen, H. J., Gibson, G. R., Elfferich, P., Raanags, G. C., Wildeboer-Veloo, A. C., Argaiz, A. (2000). Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human facial bacteria. *Microbiol Lett*, (183), 125–129.
83. Holland, K. T., Bojar, R. A., (2002). Cosmetics. What is their influence on the skin microflora? *American Journal of Clinical Dermatology*, (3), 445–449.
84. Whisner, C. M., Castillo, L. F. (2018). Prebiotics, bone and mineral metabolism. *Calcified Tissue International*, 102(4), 443-479.
85. Scholz-Ahrens, K.E., Schrezenmeir, J. (2002). Inulin, oligofructose and mineral metabolism – experimental data and mechanism. *British Journal of Nutrition*, (87), 179–186.
86. Weaver, C.M., Martin, B.R., Story, J.A. (2010). Novel fibers increase bone calcium content and strength beyond efficiency of large intestine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (58), 8952–8957.

## 5. POPIS SIMBOLA

GOS – galaktooligosaharidi

ES – međukompleks enzim-supstrat

$Y$  – prinos galaktooligosaharida [%]

$Y_{max}$  – maksimalni prinos galaktooligosaharida [%]

$X$  – početna koncentracija laktoze [%]

$DLH$  – stupanj hidrolize laktoze [%]

$RL$  – rezidualna/preostala koncentracija laktoze [g/kg]

$IL$  – početna koncentracija laktoze [g/kg]

MBR – membranski bioreaktor

PEI – polietilenimin

MF – mikrofiltracija

UF – ultrafiltracija

TMP – transmembranski pritisak/tlak

## 6. ŽIVOTOPIS

Erza Stajku [REDACTED] Osnovnu školu završila je u Koprivnici, nakon čega je upisala opću gimnaziju „Fran Galović“ također u Koprivnici. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Ekoinženjerstvo, upisala je 2020. godine u Zagrebu. Stručnu praksu odradila je u tvornici Ina Maziva u 7. mjesecu 2024. godine.