

JUSTYNA BORAWSKA, WŁODZIMIERZ BEDNARSKI,  
JOANNA GOŁĘBIEWSKA

## CHARAKTERYSTYKA SACHARYDÓW MIODU ORAZ MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA *BIFIDOBACTERIUM* DO MODYFIKACJI ICH SKŁADU I WŁAŚCIWOŚCI

### Streszczenie

Miód jest produktem o złożonym składzie chemicznym, w którym cukry stanowią ok. 80 %. Wśród cukrów ok. 90 % stanowią glukoza i fruktoza. Oligosacharydy występują w niewielkich ilościach, ale dzięki właściwościom prebiotycznym wpływają korzystnie na organizm człowieka.

Opracowanie zawiera krótką charakterystykę sacharydów miodu, w tym oligosacharydów wraz z ich znaczeniem fizjologicznym. Przedstawiono przykłady enzymatycznej modyfikacji sacharydów miodu w kierunku zwiększenia udziału prozdrowotnych oligosacharydów. Wskazano, że można w tym celu stosować *Bifidobacterium*, które wykazują aktywność enzymów glikolitycznych.

Przedstawiono wyniki badań własnych, w których wybrano dwa szczepy *Bifidobacterium*, wykazujące pożądaną aktywność enzymatyczną. Stwierdzono, że dominują w nich enzymy wewnątrzkomórkowe.

**Słowa kluczowe:** miód, sacharydy, enzymy glikolityczne,  $\beta$ -galaktozydaza, *Bifidobacterium* sp.

### Wprowadzenie

Rozwój metod analitycznych pozwala na szczegółowe zbadanie składu miodu [3] oraz znaczenia poszczególnych jego składników dla zdrowia człowieka. Analizowane są: działanie na drobnoustroje (w tym patogeny), właściwości antybiotyczne, konserwujące, przeciwutleniające, przeciwnowotworowe oraz wpływ na układ odpornościowy – immunomodulacja i immunosupresja [6, 19, 26].

Skład miodu zależny jest od substratu oraz rejonu geograficznego, z którego pochodzi, a także pory roku i warunków środowiskowych [19]. Do tej pory w miodzie oznaczono 181 substancji chemicznych. Należą do nich: sacharydy, aminokwasy

i białka, związki lotne (np. kwasy, glukany, olejki eteryczne) i mineralne, witaminy, woda i inne. Wartość energetyczna miodu wynosi ok. 300 kcal/100 g produktu [7].

Miód jest źródłem sacharydów o korzystnych właściwościach biologicznych, pełniących funkcje energetyczne bądź prebiotyczne. Dotychczas zidentyfikowano ich ponad 40, z czego 2 monosacharydy (glukozę i fruktozę), 19 disacharydów, 15 trisacharydów, 4 oligosacharydy o dłuższym łańcuchu, a także dekstryny. Rozwój dziedziny wiedzy, zajmującej się wpływem fruktozy oraz oligosacharydów na zdrowie człowieka, uzasadnia potrzebę zainteresowania się wpływem sacharydów miodu na organizm konsumentów z uwzględnieniem modyfikacji ich właściwości prozdrowotnych.

Oligosacharydy, złożone z podjednostek glukozy, galaktozy i fruktozy, wykazują szereg korzystnych właściwości technologicznych i żywieniowych, a część z nich zaliczana jest do prebiotyków. Ich pozytywne oddziaływanie na organizm polega na selektywnej stymulacji wzrostu pałeczek mlekowych, głównie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, bytujących w jelicie grubym człowieka. Zwiększenie populacji oraz aktywności fermentacyjnej tych bakterii ogranicza liczebność drobnoustrojów patogennych. Wzrost populacji bifidobakterii w przewodzie pokarmowym wpływa także na pracę tego układu (np. zapobiegając biegunkom, czy zmniejszając ryzyko nowotworów jelita grubego) oraz całego organizmu (poprzez immunomodulację, immunostymulację, obniżanie poziomu cholesterolu we krwi, zapobieganie osteoporozie i próchnicy) [14, 15, 21].

W biomacie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* zidentyfikowano zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe enzymy glikolityczne, z których te drugie charakteryzują się znacznie większą aktywnością enzymatyczną. W grupie biokatalizatorów przemian szlaku glikolitycznego zwraca się uwagę na  $\alpha$ - i  $\beta$ -galaktozydazę [27, 28]. Enzymy te charakteryzują się zdolnością do katalizowania hydrolizy lub transgalaktozylacji wiązań  $\alpha$ - bądź  $\beta$ -galaktozydowych, dlatego mogą być wykorzystywane w syntezie galaktooligosacharydów (GOS).

Celem przedstawionego opracowania jest charakterystyka składu i właściwości sacharydów miodu oraz wskazanie kierunków i możliwości enzymatycznej modyfikacji składu oligosacharydów miodu ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania *Bifidobacterium*.

### **Charakterystyka składu i właściwości oligosacharydów miodu**

Zgodnie z definicją podaną przez Kączkowskiego [17] oligosacharydy są związkami zbudowanymi z nie więcej niż 10 reszt monosacharydów. Zwyczajowo dzieli się je na „di-, tri- i tetrasacharydy oraz na oligosacharydy zawierające większą liczbę reszt cukrów prostych w cząsteczce” [17]. Niektóre zaliczane są do prebiotyków.

Miód w około 80 % składa się z sacharydów. Stanowią one do 98 % jego suchej masy [13, 20], z czego w przeważającej ilości są to monosacharydy – glukoza i frukto-

za. Oligosacharydy stanowią zaledwie ok. 10 % wszystkich cukrów miodu, za wyjątkiem większej zawartości melecycyzy w miodach spadziowych [9, 19]. Są to m.in.: sacharoza, trehaloza, trehaluloza, soforoza, laminaribioza, maltoza, maltuloza, nigerioza, turanoza, koibioza, palatynoza, celobioza, gencjobioza, melibioza, izomaltoza, inulobioza, neotrehaloza, leukroza, 1-kestoza, teandroza, rafinoza, erloza, melecycyza, panoza, izopanoza, maltotrioza, izomaltotrioza, centoza, 6- $\alpha$ -glukozylosacharoza, 3- $\alpha$ -glukozyloizomaltoza oraz izomaltotetroza, izomaltopentoza, dekstrantrioza, stachioza, werbaskoza, arabogalaktomannan, a także dekstryny [9, 10, 13, 18]. W znacznej większości oligosacharydy pochodzą z substratu, czyli nektaru lub spadzi zależnych od pochodzenia geograficznego, dlatego niektóre z nich występują tylko w konkretnych odmianach miodu [8, 10].

Znaczna część znanych oligosacharydów miodu wykazuje właściwości prebiotyczne. Są to głównie fruktooligosacharydy (FOS), z czego najbardziej aktywną pod tym względem jest panoza [2].

Udowodniono prebiotyczne właściwości miodu, związane z obecnością oligosacharydów. Ich zawartość zależy przede wszystkim od źródła (rodzaju kwiatów), z którego pobierany jest nektar przez pszczoły [25]. Obecność oligosacharydów w miodzie jest związana z aktywnością  $\alpha$ -D-glukozydazy pszczół, która katalizuje transfer grup  $\alpha$ -D-glukopyranozytowych z sacharozy do innych sacharydów. W wyniku tej reakcji powstają głównie fruktooligosacharydy oraz inne oligosacharydy.

Miód uznaje się za naturalne źródło prebiotyków. Wskazane jest jego stosowanie jako składnika żywności prozdrowotnej. Na przykład Chick i wsp. [7] wykazali, że 5 % dodatek miodu do mleka odtłuszczonego zwiększa żywotność *B. bifidum* Bf-13 oraz wpływa na prowadzony przez nie proces fermentacji na korzyść wytwarzania kwasu mlekowego, ograniczając ilość syntetyzowanego kwasu octowego. Podobnie Shin i Ustunol [30] udowodnili korzystny wpływ dodatku miodu na wzrost bakterii: *B. longum* ATCC 15707, *B. adolescentis* ATCC 15705, *B. breve* ATCC 15700, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. infantis* ATCC 15697 i stężenie wytwarzanych przez nie kwasów mlekowego i octowego. Oba zespoły korzystny wpływ przypisały obecności oligosacharydów. Autorzy udowodnili także zdolność inhibowania wzrostu bakterii niekorzystnych, tj.: *Clostridium perfringens* i *Eubacterium aerofaciens*, przez bifidobakterie podczas wzrostu na podłożu z dodatkiem miodu [25].

### Procesy enzymatyczne w modyfikacji oligosacharydów

Aktualnie popyt na oligosacharydy jest duży i systematycznie rośnie. Poza przemysłem spożywczym wykorzystuje się je do produkcji kosmetyków i farmaceutyków, dlatego wciąż poszukiwane są nowe metody ich otrzymywania. W produkcji prebiotycznych oligosacharydów w dużym zakresie stosowane są procesy enzymatyczne [1,

5, 22]. Przykłady zastosowania enzymów do otrzymywania prebiotycznych oligosacharydów podano w tab. 1.

Tabela 1

Przykłady prebiotycznych oligosacharydów oraz metody ich otrzymywania.  
Examples of pre-biotic oligosaccharides and methods of producing them.

Oligosacharydy Oligosaccharides	Surowce, metody otrzymywania Raw materials, production methods
Fruktooligosacharydy Fructooligosaccharides (FOS)	Cykoria, częściowa enzymatyczna hydroliza inuliny lub synteza z sacharozy z zastosowaniem $\beta$ -fruktofuranazydazy Chicory, a partial enzymatic hydrolysis of inulin or synthesis from sucrose with the use of $\beta$ -fructofuranosidase
Glukooligosacharydy Glucooligosaccharides	Produkowane z sacharozy jako donora glukozy transferowanej do maltozy (akceptora) z udziałem glukozylotransferazy Produced from sucrose regarded a glucose donor transferred to maltose (acceptor) with the use of glucosyl transferase
Izomaltooligosacharydy Isomaltooligosaccharides	Produkowane w procesie enzymatycznej hydrolizy skrobi z zastosowaniem $\alpha$ -glukozydazy o aktywności transglukozylacyjnej Produced in the process of enzymatic hydrolysis of starch using the $\alpha$ -glucosidase with transglucosylation activity
Laktosacharoza Lactosucrose	Produkowane z laktozy i sacharozy z zastosowaniem transglukozylacyjnej aktywności $\beta$ -fruktofuranazydazy Produced from lactose and sucrose using the transglucosylation activity of $\beta$ -fructofuranosidase
Galaktooligosacharydy Galactooligosaccharides (GOS)	Produkowane z laktozy w procesie transgalaktozytacji z zastosowaniem $\beta$ -galaktozydazy Produced from lactose in the process of transgalactosylation using the $\beta$ -galactosidase
Ksylooligosacharydy Xylooligosaccharides	Produkty enzymatycznej hydrolizy ksylanu lub arabinoksydanu np. z kolb kukurydzianych, owsa, pszenicy Products of enzymatic hydrolysis of xylan or arabinoksydanu such as from corn cobs, oats, wheat

Z udziałem enzymów z klasy hydrolaz prowadzone są dwa typy reakcji: rozkład polisacharydów do odpowiednich oligosacharydów lub synteza nowych oligosacharydów, przy dużym stężeniu monosacharydów. Wydajność syntezy prebiotyków w reakcjach prowadzonych z udziałem transferaz jest stosunkowo duża i mieści się w zakresie 10 - 43 % [12, 21].

Istnieje możliwość zastąpienia preparatów enzymatycznych komórkami drobnoustrojów, bez konieczności wyodrębniania z nich enzymów. Główną tego korzyścią jest znaczne zmniejszenie kosztów produkcji biopreparatów oraz eliminacja strat aktywności enzymów w procesie ich wydzielania.

Grubiak i Synowiecki [13] zastosowali komórki *E. coli* BL21 (DE3), które zostały transformowane wektorem zawierającym gen termostabilnej  $\beta$ -galaktozydazy z hipertermofilnego archeona *Pyrococcus wosei*. Autorzy stwierdzili, że preparat rekombinowanych komórek *E. coli* jest efektywnym katalizatorem reakcji syntezy galaktozylofruktozy z fruktozy i laktozy, o maksymalnej wydajności reakcji (30,52 g/l) w temp. 80 °C. Znane są także przykłady stosowania biomasy *Bifidobacterium* jako biokatalizatora w syntezie oligosacharydów [12, 27].

### **Charakterystyka aktywności enzymów glikolitycznych *Bifidobacterium***

*Bifidobacterium* sp. należą do naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt [23]. Są to Gram-dodatnie, heterofermentatywne bakterie beztlenowe, których komórki mają kształt rozgałęzionych pałeczek [20]. Należą do grupy bakterii fermentacji mlekowej. Jako źródło węgla mogą wykorzystywać laktozę, glukozę, galaktozę, sacharozę lub fruktozę. Optymalne warunki ich rozwoju to środowisko o kwasowości odpowiadającej pH 6,5 - 7,0 i temp. 20 - 46 °C [26].

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* sp. kolonizują błony śluzowe jelita człowieka, odgrywając korzystną rolę w funkcjonowaniu tego układu, jak i całego ustroju [27]. Większość bifidobakterii wykazuje aktywność antagonistyczną w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Substancjami wykazującymi tzw. niespecyficzną inhibicję są przede wszystkim kwas mlekowy i octowy, bakteriocyny oraz nadtlenek wodoru [16].

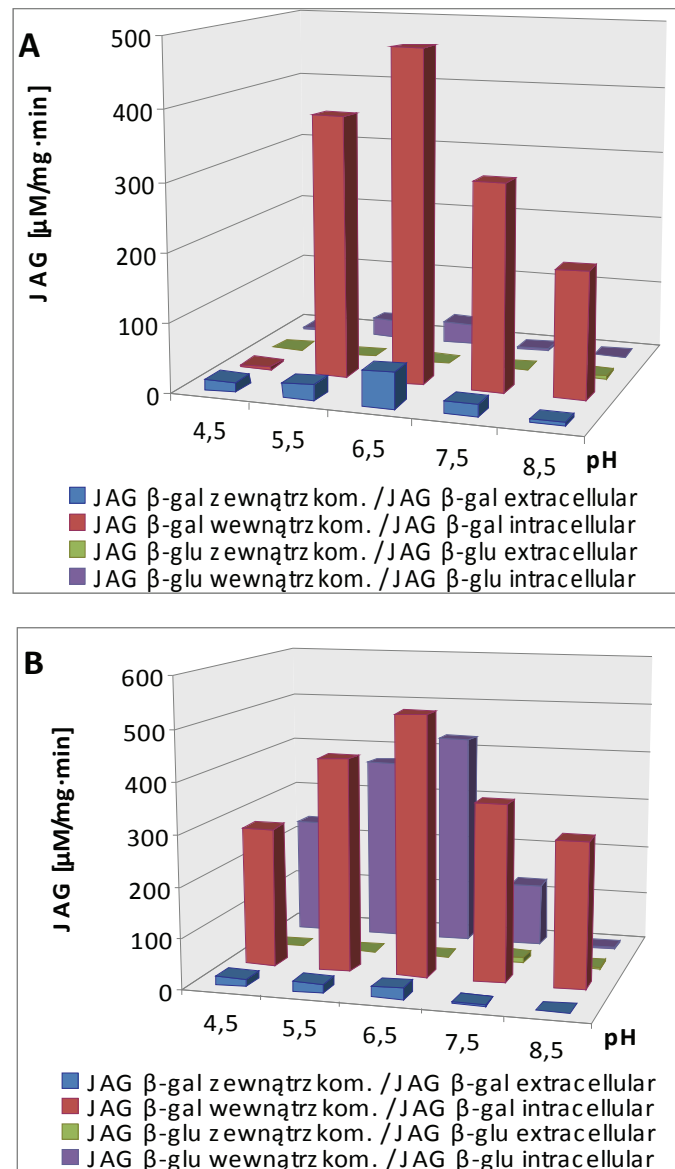
W biomacie bifidobakterii zidentyfikowano zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe enzymy glikolityczne, z których te drugie wykazują znacznie większą aktywność enzymatyczną. Do biokatalizatorów przemian szlaku glikolitycznego zaliczono  $\alpha$ - (EC 3.2.1.22) i  $\beta$ -galaktozydazę (EC 3.2.1.23) [27, 28]. Enzymy te charakteryzują się zdolnością katalizowania reakcji hydrolizy lub transgalaktozylacji wiązań  $\alpha$ - bądź  $\beta$ -galaktozydowych.

Z badań Goulasa i wsp. [12] wynika, że  $\beta$ -galaktozydaza w komórkach *Bifidobacterium* jest związana ze ścianą komórkową. Ściany komórkowe tych bakterii można rozpatrywać jako naturalne nośniki enzymu. Preparaty otrzymane po dezintegracji komórek lub po preparowaniu ścian w celu poprawy ich przepuszczalności np. za pomocą toluenu można stosować jako preparaty enzymatyczne. Goulas i wsp. [12] tak otrzymane preparaty zastosowali w syntezie galaktooligosacharydów. Wydajność reakcji wynosiła od 36 do 43 %, głównie w zależności od stężenia glukozy i galaktozy jako inhibitorów tego procesu.

Aktywności: hydrolityczna i transferazowa galaktozydaz są ze sobą nierozdzielnie związane i mają wspólny mechanizm, obejmujący trzy etapy. Dopiero ostatni z nich, w którym następuje przeniesienie reszty galaktozylowej na cząsteczkę akceptora (wody lub cukru), decyduje o charakterze reakcji (hydroliza czy transglikozylacja) [29]. Przykładowo przy zastosowaniu  $\alpha$ -galaktozydazy z *B. adolescentis* DSM 20083, hydrolizującej melibiozę, rafinozę i stachiozę, oraz koncentracji substratu – melibiozy, poniżej 300 mM, dominowała reakcja hydrolizy [28]. Natomiast zwiększenie stężenia melibiozy powyżej 300 mM wpłynęło na zwiększenie aktywności transgalaktozylacyjnej. Przesunięcie aktywności enzymu w kierunku transgalaktozylacji wymaga optymalizacji warunków reakcji (poprzez zmianę: pH, temperatury oraz stężenia substratu) [34] bądź modyfikacji struktury enzymu [14].

$\beta$ -galaktozydazy izolowane z różnych szczepów bifidobakterii różnią się między sobą budową oraz funkcją. Przykładowo z *B. bifidum* wyizolowano i sklonowano 3  $\beta$ -galaktozydazy o różnej budowie cząsteczek [15]. Z kolei z komórek *B. adolescentis* wyizolowano  $\beta$ -galaktozydazę, która charakteryzowała się wysoką specyficznością do hydrolizy wiązań w dużych cząsteczkach galaktooligosacharydów (stopień polimeryzacji powyżej 2), nie rozkładając laktozy [15]. Następnie z hodowli *B. adolescentis* wyizolowano i oczyszczono galaktozydazę  $\beta$ -Gal II o aktywności 526 U/mg [15]. Tzortzis i wsp. [27] zbadali aktywność enzymatyczną  $\beta$ -galaktozydazy syntetyzowanej przez *B. bifidum* NCIMB 41171. Stwierdzili, że optymalne warunki działania enzymu to pH 6,8 - 7,0 i temp. 40 °C, przy czym temp. 43 °C całkowicie inaktywowała enzym w komórkach. Najkorzystniejszą wydajność syntezy GOS cytowani autorzy stwierdzili przy stężeniu laktozy 550 mg/ml, pH 6,8 i temp. 39 °C. Otrzymane wyniki pozwoliły także stwierdzić, że wzrost stężenia substratu wpływa na zwiększenie wydajności syntezy galaktooligosacharydów. Największa aktywność enzymu  $\beta$ -galaktozydazy z *B. bifidum* NCIMB 41171, wykorzystanego przez Goulasa i wsp. [12] do syntezy GOS, została oznaczona w środowisku o kwasowości pH 6,5 oraz w temp. 40 - 45 °C.

Van Laere i wsp. [28] wykazali, że synteza oligosacharydów przez  $\alpha$ -galaktozydazę wyizolowaną z *B. adolescentis* DSM 20083 zachodziła najbardziej wydajnie w środowisku o kwasowości odpowiadającej pH 7 i w temp. 40 °C. Z kolei najwyższą aktywność  $\alpha$ -galaktozydazy syntetyzowanej przez *B. infantis* stwierdzono w środowisku o kwasowości pH 6,0, natomiast w środowisku o kwasowości pH 3,0 - 4,5 enzym pozostawał całkowicie nieaktywny [24]. Podobnie maksymalną aktywność  $\alpha$ -galaktozydazy syntetyzowanej przez *B. longum* CRL 849 stwierdzono w środowisku o kwasowości pH 5 - 8 [11]. Stwierdzono także, że w środowisku o temp. powyżej 60 °C enzym jest inaktywowany.



Rys. 1. Wpływ kwasowości czynnej środowiska na zmiany aktywności (JAG) zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej β-galaktozydazy i β-glukozydazy syntetyzowanej przez szczepy *Bifidobacterium bifidum* 29521 (A) i *B. catenulatum* ATCC27539 (B).

Fig. 1. Effect of active acidity of environment on changes in activity (JAG) of extra- and intracellular β-galactosidase and β-glucosidase synthesized by *Bifidobacterium bifidum* 29521 (A) and *B. catenulatum* ATCC27539 (B) strains.



Różne gatunki oraz szczepy *Bifidobacterium* wytwarzają galaktozydazy o różnych właściwościach i budowie. Jedne charakteryzują się wysoką specyficnością do hydrolizy laktozy, inne do oligosacharydów prebiotycznych, jeszcze inne mają enzymy o dużej aktywności transgalaktozylacyjnej i same wytwarzają oligosacharydy [15].

W badaniach własnych przeprowadzono analizę aktywności zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów glikolitycznych ( $\alpha$ - i  $\beta$ -galaktozydazy oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukozydazy) 24 szczepów *Bifidobacterium* spp. (IRZiBŻ PAN, Olsztyn) w środowisku o kwasowości odpowiadającej pH 4,5 - 8,5. W oznaczeniach aktywności enzymów zastosowano metodykę opisaną przez Goulasa i wsp.[12].

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że spośród badanych szczepów *B. catenulatum* ATCC27539 wykazuje najwyższą aktywność  $\beta$ -galaktozydazy i  $\beta$ -glukozydazy, których optimum zaobserwowano w środowisku o kwasowości odpowiadającej pH 5,5 - 6,5 (rys. 1). Aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych była wielokrotnie wyższa niż enzymów wydzielanych poza światło komórki. Podobnie optymalną aktywność glikozydaz *B. bifidum* 29521 zaobserwowano w środowisku o kwasowości pH 5,5 - 6,5. Pozostałe badane szczepy charakteryzowały się mniejszymi aktywnościami enzymów glikolitycznych, jednak w każdym przypadku aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych była znacznie większa niż zewnątrzkomórkowych. Do kolejnego etapu badań, zmierzającego do modyfikacji składu sacharydów w miodzie, wytypowano wskazane wyżej 2 szczepy bakterii.

Uzasadnienie kontynuacji naszych badań polega na założeniu, że niska zawartość wody i aktywność wody oraz wysoka osmolarność miodu powinny sprzyjać lizie komórek bakteryjnych *Bifidobacterium* i uwalnianiu wewnątrzkomórkowych glikozydaz, które, jak wykazano, są bardziej aktywne niż zewnątrzkomórkowe. Uwolnione enzymy wewnątrzkomórkowe wraz z miodem planuje się dodawać do mleka lub permeatu po ultrafiltracji mleka i opracować warunki reakcji syntezy galaktooligosacharydów, a następnie otrzymane surowce ze zwiększoną koncentracją oligosacharydów zastosować w produkcji jogurtu.

## Podsumowanie

Przedstawiono informacje o składzie i właściwościach sacharydów miodu. Szczególną uwagę zwrócono na zawartość prozdrowotnych oligosacharydów oraz na czynniki decydujące o ich stężeniu w miodzie. Zaprezentowano przykłady enzymatycznej modyfikacji składu sacharydów. Wskazano na potencjalne możliwości zastosowania wybranych szczepów *Bifidobacterium* jako źródła enzymów glikolitycznych zdolnych do syntezy np. galaktooligosacharydów. Na podstawie wyników badań własnych, poinformowano o wyselekcjonowaniu dwóch szczepów *Bifidobacterium* wykazujących ww. właściwości. Wykazano, że aktywność enzymów glikolitycznych zewnątrz- i we-



wnątrzkomórkowych syntetyzowanych przez wybrane szczepy *Bifidobacterium sp.* zależy od kwasowości środowiska. Otrzymane wyniki wskazują, że kwasowość środowiska w zakresie pH 5,5 - 6,5 jest najbardziej korzystna dla działania analizowanych enzymów glikolitycznych.

### Literatura

- [1] Adamczak A., Bednarski W.: Enzymatyczna synteza galaktooligosacharydów i laktulozy w permeacie po ultrafiltracji serwatki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **6 (61)**, 105-117.
- [2] Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E., Battino M.: Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr. J. Nutr. Metab.*, 2010, **3**, 15-23.
- [3] AOAC Official Method 977.20. Separation of sugars in honey. 2006.
- [4] Arias V.C., Castells R.C., Malacalza N., Lupano C.E., Castells C.B.: Determination of oligosaccharide patterns in honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Chromatogr.*, 2003, **58**, 797-801.
- [5] Bednarski W., Kulikowska A.: Wpływ warunków reakcji na wydajność enzymatycznej syntezy galaktooligosacharydów przez  $\beta$ -galaktozydazę z *Penicillium canescens*. *Biotechnologia*, 2007, **77**, 137-148.
- [6] Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., Piacentini M.P., Albertini M.C., Piatti E.: Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.*, 2006, **97**, 217-222.
- [7] Chick H., Shin H.S., Ustunol Z.: Growth and acid production by lactic acid bacteria and Bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *J. Food Sci.*, 2001, **66**, 478-481.
- [8] Cotte J.F., Casabianca H., Chardon S., Lheritier J., Grenier-Loustalot M.F.: Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *J. Chromatogr. A*, 2003, **1021**, 145-155.
- [9] Da Costa Leite J.M., Trugo L.C., Costa L.S.M., Quinteiro L.M.C., Barth O.M., Dutra V.M.L., De Maria C.A.B.: Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chem.*, 2000, **70**, 93-98.
- [10] de la Fuente E., Sanz M.L., Martinez-Castro I., Sanz J., Ruiz-Matute A.I.: Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chem.*, 2007, **105**, 84-93.
- [11] Garro M.S., De Giori G.S., De Valdez G.F., Olives G.:  $\alpha$ -D-Galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1994, **19**, 16-19.
- [12] Goulas A., Tzortzis G., Gibson G.R.: Development of a process for the production and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Int. Dairy J.*, 2007, **17**, 648-656.
- [13] Grubiak K., Synowiecki J.: Wykorzystanie komórek *Escherichia coli* transformowanych genem termostabilnej  $\beta$ -galaktozydazy z *Pyrococcus wosei* do wytwarzania galaktozylofruktozy. *Biotechnologia*, 2009, **1 (84)**, 152-162.
- [14] Hinz S.W.A., Doeswijk C.H.L., Schipperus R., van den Broek L.A.M., Vincken J.P., Voragen A.G.J.: Increasing the transglycosylation activity of  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 by site directed mutagenesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, **93**, 122-131.
- [15] Hinz S.W.A., van den Broek L.A.M., Beldman G., Vincken J.-P., Voragen A.G.J.:  $\beta$ -Galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 prefers  $\beta$ -(1,4)-galactosides over lactose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **66 (3)**, 276-284.
- [16] Jakubczyk E., Kosikowska M.: Dobroczynny wpływ pałeczek kwasu mlekowego i *Bifidobacterium sp.* na zdrowie ludzi. *Przem. Spoż.*, 1996, **10**, 26-29.

- [17] Kączkowski J.: Przemiany sacharydów. W: *Biochemia roślin – pod red. J. Kączkowskiego*. PWN, Warszawa 1993, ss. 26-32.
- [18] Kaškonienė V., Venskutonis P.R., Čeksterytė V.: Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2010, **43**, 801-807.
- [19] Kędzia B., Hołderna-Kędzia E.: *Miód. Skład i właściwości biologiczne*. Przech. Wyd. Rzeczpospolita SA, Warszawa 2008.
- [20] Klijn A., Mercenier A., Arigoni F.: Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, **29**, 491-509.
- [21] Kubik C., Piasecka K., Anyszka A., Bielecki S.: Polifruktany i fruktooligosacharydy (FOS) – występowanie, otrzymywanie i zastosowanie. *Biotechnologia*, 2006, **73**, 103-116.
- [22] Olesienkiewicz A., Grajek W.: Enzymatyczna synteza oligosacharydów. W: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności – pod red. E. Kołakowskiego, W. Bednarskiego i S. Bieleckiego*. Wyd. AR, Szczecin 2005, ss. 431-449.
- [23] Palacios M.C., Sanz Y., Haros M., Rosell C.M.: Application of *Bifidobacterium* strains to the breadmaking process. *Process Biochem.*, 2006, **41**, 2434-2440.
- [24] Roy D., Berger J.-L., Reuter G.: Characterization of dairy-related *Bifidobacterium* spp. based on their  $\beta$ -galactosidase electrophoretic patterns. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, **23**, 55-70.
- [25] Shin H.S., Ustunol Z.: Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An *in vitro* comparison. *Food Res. Int.*, 2005, **38**, 721-728.
- [26] Socha J., Stolarczyk A., Socha P.: Miejsce bifidobakterii w profilaktyce i leczeniu wybranych chorób wieku dziecięcego. *Pediatrica Współczesna*, 2002, **4 (1)**, 43-47.
- [27] Tzortzis G., Goulas A.K., Gibson G.R.: Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **68**, 412-416.
- [28] Van Laere K.M.J., Hartemink R., Beldman G., Pitson S., Dijkema C., Schols H.A., Voragen A.G.J.: Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083  $\alpha$ -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **52**, 681-688.
- [29] Wanarska M., Kur J.:  $\beta$ -D-galaktozydazy – źródła, właściwości i zastosowanie. *Biotechnologia*, 2005, **71**, 46-62.

#### PROFILE OF HONEY SACCHARIDES AND POSSIBILITIES OF APPLYING *BIFIDOBACTERIUM* TO MODIFY THEIR COMPOSITION AND PROPERTIES

##### Summary

Honey is a product of complex chemical composition with sugars constituting about 80 % thereof. Glucose and fructose cover ca. 90 % of all the sugars contained therein. Oligosaccharides are present in small quantities, but owing to their pre-biotic properties, they have a beneficial effect on the human body.

The study comprises a brief description of honey saccharides including oligosaccharides and their physiological significance. Some examples are represented of enzymatic modification of honey saccharides factors, intended to increase the content of healthfully acting oligosaccharides. It was suggested that *Bifidobacterium* could be used for this purpose since they demonstrated glycolytic enzymes activity.

The results of the authors' own study were shown; the study comprised two selected strains of *Bifidobacterium* exhibiting a desired enzymatic activity required. It was found that intracellular enzymes predominated therein.

**Key words:** honey, saccharides, glycolytic enzymes,  $\beta$ -galactosidase, *Bifidobacterium* sp. ☒