

ARTUR SZWENGIEL, MARIA CZARNECKA, LEONARDA GRUCHAŁA,
ZBIGNIEW CZARNECKI

WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE LEWANU

Streszczenie

Lewan jest wielkocząsteczkowym β -(2 \rightarrow 6)-fruktofuranosylo-fruktanem z β -(2 \rightarrow 1) terminalną resztą przyłączoną do α -glukopiranozy. Wiedza o występowaniu, biosyntezie i właściwościach tego fruktanu jest obszerna. Wyniki badań wskazują na duży aplikacyjny potencjał lewanu i produktów jego hydrolizy w obszarze żywności o właściwościach prozdrowotnych. Głównymi czynnikami ograniczającymi zastosowanie lewanu w żywieniu jest jego dostępność i brak jednoznacznych wyników dotyczących kompleksowego oddziaływania lewanu na organizm człowieka i/lub zwierząt doświadczalnych. Praca jest studium dotyczącym wskaźników prozdrowotnego działania lewanu i niektórych lewanooligosacharydów. Dokonano również przeglądu możliwości zastosowania lewanu.

Słowa kluczowe: lewan, prebiotyki, SCFA, przeciwnowotworowe właściwości, funkcjonalne cechy

Wprowadzenie

Polisacharydy powszechnie występują w świecie roślin i stanowią dla organizmu człowieka źródło energii i/lub błonnika pokarmowego. W produktach żywnościowych mogą być rozpatrywane jako składniki o określonej wartości odżywczej, a także o zdefiniowanych funkcjach technologicznych, które ściśle związane są z ich właściwościami fizykochemicznymi. Współcześnie obserwuje się, że część konsumentów oczekuje, aby żywność była nie tylko źródłem podstawowych składników odżywczych, ale by również zawierała naturalne prozdrowotne składniki. Postawy części konsumentów inspirują producentów do projektowania i wytwarzania produktów żywnościowych zawierających składniki prozdrowotne (i/lub składniki funkcjonalne).

Szczególnie interesującą grupą związków są krótko- i długołańcuchowe fruktany, czyli di- (inulobioza, lewanobioza), oligo- (1-kestoza, 6-kestoza, 6_G-kestoza) oraz polimery (inulina, lewan) fruktozy. Najpowszechniej znanym fruktanem, stymulującym

Dr inż. A. Szewngiel, dr inż. M. Czarnecka, dr inż. L. Gruchała, prof. dr hab. Z. Czarnecki, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-624 Poznań

efekty prozdrowotne jest inulina – β -(2→1)-glikozyd, który obecnie stanowi składnik wielu produktów mlecznych oraz suplement diety.

Lewan jest fruktanem syntetyzowanym przez wiele bakterii, u których stanowi egzośluz, występuje także w niewielkich ilościach w roślinach jednoliściennych, w skali laboratoryjnej pozyskiwany jest w procesach biotechnologicznych. Zbudowany jest z reszt fruktozy połączonych wiązaniami β -(2→6)-glikozydowymi, które nie są rozkładane przez enzymy trawienne w organizmie człowieka, dlatego przypuszcza się, że może on stanowić czynnik bifidogenny. Brak wystarczających danych doświadczalnych nie pozwala jednoznacznie zaklasyfikować ten polimer jako prebiotyku. Lewan w przeciwieństwie do inuliny nie tworzy struktury żelu, cechuje się wysoką masą cząsteczkową i m.in. dlatego poza wzmiankowanym aspektem bifidogennym rozważa się także szereg potencjalnych aplikacji w zakresie modyfikacji konsystencji, przyczepności i spójności produktów spożywczych.

Prebiotyki i probiotyki, żywność funkcjonalna – pojęcia podstawowe

Prebiotyki to niestrawne składniki żywności, które korzystnie wpływają na gospodarza przez selektywną stymulację wzrostu i/lub modyfikację aktywności metabolicznej jednego lub określonej liczby gatunków bakterii obecnych w okrężnicy [24]. Z prebiotykami powiązane są probiotyki, czyli niepatogenne mikroorganizmy, głównie pochodzenia ludzkiego, których przyjmowanie w odpowiednich ilościach skutkuje korzyściami zdrowotnymi dla gospodarza i umożliwia przeciwdziałanie określonym schorzeniom lub też polepsza stan chorego przy niektórych dolegliwościach zdrowotnych [19]. Synbiotykiem natomiast jest kombinacja probiotyku z prebiotykiem, w ogólnym założeniu korzystnie modyfikuje mikroflorę jelitową i jej metabolizm. Sugeruje się, że prebiotyki mogą podwyższać przeżywalność bakterii probiotycznych podczas przejścia przez górne odcinki przewodu pokarmowego i tym samym wzmagać pozytywne efekty w jelicie grubym, a indywidualne zalety pre- i probiotyków mogą być addytywne lub też działać synergistycznie [5]. Często utożsamia się pojęcie prebiotyku z czynnikiem bifidogennym i w pewnym zakresie są to zagadnienia zbieżne z zastrzeżeniem, że czynnik bifidogenny stymuluje jedynie wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* zatem jest zawężonym znaczeniowo prebiotykiem [38]. W obrębie tych pojęć funkcjonują tzw. składniki prozdrowotne, które obejmują ogół zdefiniowanych składników oddziałujących pośrednio lub też bezpośrednio na organizm człowieka, wywołując w efekcie poprawę stanu zdrowia/samopoczucia. Zwięzły termin obejmujący produkty żywnościowe o działaniu prozdrowotnym stanowi pojęcie żywności funkcjonalnej, czyli produktów, których prozdrowotne oddziaływanie i/lub zmniejszenie ryzyka chorób zostało udowodnione naukowo. W tym kontekście pro- i prebiotyki stanowią jeden z obszarów badań nad funkcjonalnymi składnikami żywności [19].

Celem niniejszej pracy jest przybliżenie odpowiedzi na pytanie – czy lewan ze względu na swoje potencjalnie korzystne oddziaływanie na organizm człowieka może w przyszłości stanowić wartościowy składnik żywności funkcjonalnej?

Należy zatem przybliżyć pokrótce docelowe funkcje powiązane z fizjologią przewodu pokarmowego i wskaźnikami, które je wyznaczają. I tak, niestrawnym sacharydom, w tym i prebiotykom, przypisuje się wpływ na: optymalizację perystaltyki jelit i formowanie stolca (wskaźnikami są masa, konsystencja i forma stolca, częstotliwość wypróżniania oraz czas przejścia masy kałowej), skład mikroflory okrężnicy (wyznacznikiem jest skład mikroflory i jej aktywność enzymatyczna/metaboliczna), funkcjonowanie tkanki limfatycznej w obrębie przewodu pokarmowego (GALT) (obiektywnymi markerami są immunoglobuliny A i cytokiny), procesy fermentacyjne (określa się jakościowo i ilościowo profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) oraz produkcję takich gazów, jak H_2 , H_2S), ciągłość błon śluzowych jelit (wskaźnikami są markery komórkowe, enzymy błony śluzowej, status redox) [16]. Tylko niektóre ze wzmiankowanych aspektów zgłębiono dotychczas w badaniach nad lewanem. Prezentowane w literaturze dane eksperymentalne często nie dają wystarczającej i jednoznacznej odpowiedzi, która pozwoliłaby wskazać na kierunek i efekty, jakie może przynieść dieta zawierająca lewan. Poniżej przybliżono stan wiedzy na temat właściwości i potencjalnych aplikacji lewanu.

Właściwości lewanu

Fruktany są szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin i mogą być dostarczane do organizmu człowieka z pszenicą, cebulą, czosnkiem, bananami, topinamburem, karczochami, szparagami [44]. Inulina pozyskiwana jest głównie z korzeni cykorii (*Cichorium intybus*) i topinamburu (*Helianthus tuberosus*) [22]. Często β -(2,1)-glikozydowe sacharydy są nazywane dietetycznymi fruktanami, FOS lub też oligofruktozą. Polisacharydy te różnią się jednak zarówno stopniem polimeryzacji, jak i typem wiązań chemicznych. Znane są również fruktany typu *graminan* (o wiązaniach mieszanych), występujące najpowszechniej w rodzinie *Gramineae* (wiechlinowate). Do rodziny tej należą również rośliny uprawne, w tym zboża [10]. Zawierają one zarówno wiązania β -(2,1)- i β -(2,6)-glikozydowe, podczas gdy lewan to fruktan, jak wzmiankowano powyżej, zawierający w łańcuchu głównym wiązania β -(2,6)-glikozydowe, a w rozgałęzieniach β -(2,1)-glikozydowe [30].

Liniowe i rozgałęzione fruktany serii 1-kestozy (β -(2,1)-FOS) oraz serii 6-kestozy (β -(2,6)-FOS) występują w wielu produktach żywnościowych. Zidentyfikowano 6_G-kestozę i 6-kestozę oraz tetra- i pentasacharydy jako główne ekstrahowane fruktany z mąki pszennej [33]. Komercyjne preparaty inuliny z cykorii oraz *Dahlia juarezzii* zawierają również wiązania β -(2,6)-glikozydowe (około 2 %) [10]. Dlatego lewan pozyskiwany z podłoży hodowlanych bakterii [40] lub też w wyniku syntez *in vitro* [39]

nie stanowi dla organizmu człowieka obcego strukturalnie związku i nie powinien wzbudzać u konsumentów żadnych uprzedzeń.

Szczegółowe studium odnośnie syntezy i właściwości fizykochemicznych lewanu, łącznie z charakterystyką mas cząsteczkowych jest przedmiotem pracy przeglądowej Szwengiel i innych (2009) [41]. Jakkolwiek należy nadmienić, że lewan jest związkiem, którego potencjalne właściwości prozdrowotne są zdecydowanie w większym zakresie eksponowane w literaturze, aniżeli jego właściwości fizykochemiczne. Korporacja Montana Biotech SE (Inc. Rock Hill, USA) w przeciągu kilku najbliższych miesięcy planuje rozpocząć produkcję lewanu na drodze biosyntezy z udziałem szczepu bakterii z rodzaju *Bacillus* (produkcja – Shanhai, Chiny). Produkt dostępny ma być w postaci białych płatków i zgodnie z deklaracją producenta cieszy się dużym zainteresowaniem ze strony przemysłu kosmetycznego. Zdefiniowane właściwości fizykochemiczne produktu to niska lepkość wodnych roztworów o stężeniu poniżej 20 %. W przedziale od 20 do 40 % tworzy gęstą pastę, mieszaniny o stężeniu powyżej 50 % mają konsystencję gumy. Punkt topnienia tego lewanu to temp. 225 °C, a zeszklenia 138 °C. Polimer ten jest stabilny podczas autoklawowania i degradowany w warunkach kwasowych. Nie jest cytotoksyczny – zawartość endotoksyn poniżej 615 U/ml – co stanowi zaledwie 50 % ogólnej puli endotoksyn zawartych w handlowym preparacie gumy ksantanowej [34].

Lewan wykazuje niskie wartości lepkości granicznej w odniesieniu do innych polimerów o porównywalnie wysokiej masie cząsteczkowej. Lepkość graniczna wodnych roztworów lewanu mieści się w zakresie od 0,07 do 0,18 dl/g [2]. Typowe natomiast komercyjne polisacharydy, jak: κ -karragen, galaktomannan, ksantan, celuloza hydroksypropylometylenowa, guma guarowa wykazują lepkość graniczną w zakresie od 5 do 50 dl/g [2, 7, 11, 18, 25].

Prozdrowotne właściwości lewanu

Prebiotyki, jak wspomniano wyżej, mogą selektywnie stymulować szczególną florę jelita grubego, w tym przede wszystkim bakterie fermentacji mlekowej należące do rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, które wywierają pozytywny wpływ na gospodarza [13]. Związki te powinny również hamować wzrost niepożądanych mikroorganizmów (*Clostridium* i *Bacteroides*). Przypisuje się prebiotycznym węglowodanom często wciąż nie do końca potwierdzony wpływ na organizm człowieka, tj. ochronę przed infekcjami jelitowymi, modulację reakcji (odpowiedzi) systemu immunologicznego, przeciwdziałanie nowotworowi okrężnicy, redukcję poziomu cholesterolu w surowicy krwi oraz poprawę biodostępności składników żywności [23]. Obecnie powszechnie promuje się metody selektywnej stymulacji wzrostu i aktywności bifidobakterii w jelicie poprzez suplementację diety gospodarza specyficznymi, tzw. czynnikami bifidogennymi. Bifidogenne oligosacharydy to m.in. β -galaktozo-oligosacharydy

[6], α -D-galaktozo-oligosacharydy [43] oraz jedne z ważniejszych – fruktooligosacharydy (FOS) typu inuliny [14, 15, 20].

Znane są dotychczas jedynie rezultaty badań *in vitro* dotyczących oporności lewanu na proces trawienny w wyższych odcinkach przewodu pokarmowego. Inkubacja β -(2,6)-FOS kolejno z różnymi amylazami (amylazą ślinową, trzustkową oraz amyloglukozydazą) i proteazami (pepsyną, pankreatyną, trypsyną) dowodzi wysokiej biooporności tego polimeru w górnych odcinkach przewodu pokarmowego – odzyskiwano powyżej 80 % β -(2,6)-FOS [30].

Szczepy z rodzaju *Bifidobacterium* wykorzystują β -(2,6)-FOS w zróżnicowanym stopniu. Spośród pięciu testowanych szczepów jedynie *Bifidobacterium adolescentis* był zdolny wykorzystywać zarówno krótko-, jak i długołańcuchowe formy lewanu [30]. Wcześniejsze badania [30, 32] dowodziły, że bifidobakterie nie metabolizują lewanu o wysokiej masie cząsteczkowej. Badania pozaustrojowe nad wpływem lewanu z *Erwinia herbicola* na skład flory jelitowej z użyciem ludzkich fekaliiów nie dowiodły bifidogenego działania lewanu. Użyty fruktan nie powodował wzrostu liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, natomiast w nieznacznym stopniu stymulował wzrost *Enterococcus* i *Clostridium*, a hamował wzrost *Bacteroides* [3]. Również oligomery lewanu o zmodyfikowanym stopniu polimeryzacji nie były fermentowane przez szczepy *Bifidobacterium* [46]. Rozbieżności te tłumaczy się różnicami w masie cząsteczkowej zastosowanych lewanów. Określono, że masa cząsteczkowa około 3200 Da jest czynnikiem limitującym wykorzystanie lewanu przez testowane szczepy bakteryjne [30]. Wcześniej odnotowywane obserwacje wydają się być tym bardziej słuszne, że i polimery inuliny o masach cząsteczkowych wyższych niż 4500 Da nie były wykorzystywane przez *Bifidobacterium infantis* [48]. Obserwacje niezależnych autorów potwierdzają, że stopień wykorzystania inuliny przez bifidobakterie zależy od stopnia polimeryzacji i czystości preparatów [5]. Głównymi czynnikami decydującymi o podatności sacharydów na procesy fermentacyjne są: struktura, rodzaj monomerów tworzących cząsteczkę, stopień polimeryzacji oraz prawdopodobnie stopień rozgałęzienia, jak również rozpuszczalność w wodzie [4]. W tym kontekście sugestia, że masa cząsteczkowa lewanu decyduje o jego degradacji przez bakterie, a nie rodzaj wiązań pomiędzy podjednostkami fruktozowymi, wydaje się być uzasadniona. Słuszną wydaje się być również hipoteza, że hydroliza długołańcuchowych cząsteczek może stanowić przeszkodę przestrzenną dla centrum aktywnego enzymów hydrolitycznych [30]. Zatem dane literaturowe o potencjale degradacyjnym i specyficzności substratowej poszczególnych szczepów bifidobakterii są niezmiernie ważne, ponieważ w przyszłości pozwolą zaprojektować produkty o synbiotycznych cechach.

Jednym z głównych czynników decydujących o właściwościach zdrowotnych związanych ze wzrostem bifidobakterii jest produkcja SCFA (*short chain fatty acids* – krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych) w trakcie fermentacji. SCFA limitują

wzrost bakterii gnilnych i patogennych oraz są znaczącym źródłem energetycznym dla gospodarza. Ilość i proporcje poszczególnych SCFA syntetyzowanych w trakcie fermentacji determinuje wiele czynników – jednym z nich jest dostępność i rodzaj substratu energetycznego.

Testowane szczepy bakterii *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. pseudocatenuatum*, które słabo metabolizowały β -(2,6)-FOS, produkowały przede wszystkim kwas octowy i kwas mrówkowy; stosunek kwasu octowego do mlekowego dla poszczególnych kultur wynosił kolejno 76 : 1; 4,1 : 1 oraz 4,2 : 1. Szczep *B. adolescentis*, który fermentował lewan o wysokim stopniu polimeryzacji wytwarzał jako główne produkty kwas octowy i mlekowy w proporcji 2,6 : 1, natomiast fruktoza metabolizowana była głównie do kwasu octowego i mlekowego [30]. Porównując uzyskane wyniki z badaniami żywieniowymi prowadzonymi z inuliną można zauważyć duże podobieństwo. Inulina jako substrat o wysokim stopniu wykorzystania przez pożądaną florę bakteryjną, szczególnie bifidobakterie, jest metabolizowana do kwasu octowego i mlekowego w proporcji 3 : 2, tj. najkorzystniejszej dla przewodu pokarmowego człowieka [12]. W przypadku lewanu nie odnotowano, jak dotychczas tak korzystnych proporcji, każdorazowo obserwując znaczną przewagę kwasu octowego nad mlekowym. Prowadzono także badania modelowe, które miały określić wpływ suplementacji żywności lewanem na metabolizm tłuszczu. Wykorzystano wysokocząsteczkowy lewan z *Zymomonas mobilis* w badaniach *in vivo* prowadzonych na szczurach karmionych wstępnie dietą, w której 40 % podaży energii stanowił łój wołowy. Dowiedziono, że fruktan ten wykazuje hipolipidemiczne oddziaływanie. Sugerowany dietetyczny efekt lewanu, polegający na przeciwdziałaniu otyłości i obniżeniu poziomu lipidów, może być rezultatem odnotowanej w tych badaniach inhibicji lipogenezy i wzmożeniu lipolizy [26]. O korzystnym wpływie lewanu na poziom triacylogliceroli w serum krwi wzmiankowano również w pracy Yamamoto i wsp. [47]. Fruktan ten wykazuje również działanie hipocholesterolemiczne [29].

Aktywność przeciwnowotworowa lewanu

Badania *in vitro* dotyczące aktywności przeciwnowotworowej lewanów (dawka w przedziale 200 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ hodowli komórkowej) prowadzono na fruktanach pozyskanych z *Gluconoacetobacter xylinus* (G-lewan, o masie cząsteczkowej $M_w = 40000$ Da), *Microbacterium laevaniformans* (M, $M_w = 710000$ Da), *Rahnella aquatilis* (R, $M_w = 380000$ Da) i *Zymomonas mobilis* (Z, $M_w = 570000$ Da). Lewany te wykazywały relatywnie wysoką aktywność w stosunku do dwóch spośród ośmiu testowanych linii komórek rakowych, tj. do: SNU-1 (odpowiednika ludzkiej linii komórek raka wątroby – KCLB 58065) i HepG2 (odpowiednika komórek rakowych żołądka – KCLB 00001). Znacząco wyższa inhibicja wzrostu 52,54 – 62,05 % i 52,15 – 58,58 % odpowiednio w przypadku M- i R-lewanu została wykazana względem SNU-1, pod-

czas gdy M-lewan wykazywał wyższą aktywność inhibującą w stosunku do HepG2 (49,93 – 61,82 %). Testy *in vivo* prowadzone na myszach (testowano stopień zahamowania Sarcoma-180 – *med.* mięsak) wykazały około 66 % przeciwnowotworową aktywność M-, R- i Z-lewanów (zastosowana dawka 200 mg lewanu na 1 kg masy ciała myszy). Stwierdzono ponadto, że nie dawka lewanu, a masa cząsteczkowa może mieć znaczący wpływ na silniejsze właściwości przeciwnowotworowe testowanych lewanów [49]. Wpływ masy cząsteczkowej lewanu na inhibicję Sarcoma-180 zaobserwowano już we wcześniejszych badaniach dotyczących przeciwnowotworowej aktywności różnych frakcji lewanu. Badano lewan o średnich masach cząsteczkowych (\overline{M}_w) z przedziału od 353500 do 769500 Da, pozyskany z podłoży wzrostowych *Zymomonas mobilis*. Najwyższe zahamowanie komórek rakowych uzyskano stosując frakcję o $\overline{M}_w = 456900$ Da (72 % inhibicja), ze względu na dużą polidispersyjność prób użytych w badaniach (>14), trudno jednak wskazać na masę cząsteczkową, która predysponowałaby w sposób szczególnie aktywność przeciwnowotworową lewanu [8].

Modyfikacja struktury lewanu produkowanego przez bakterie *Microbacterium laevaniformans* na drodze rozkładu wiązań β -(2,1)-glikozydowych wykazała, że stopień rozgałęzienia cząsteczki ma wpływ na zakres inhibicji wzrostu komórek rakowych SNU-1 oraz HepG2. Autorzy pracy wskazują, że struktura rozgałęziona biomolekuł odgrywa znaczącą rolę w ekspresji biologicznej aktywności lewanu i powinna być brana pod uwagę podczas oznaczania aktywności przeciwnowotworowej lewanów [50]. Dysproporcje odnośnie cech jakościowych lewanu, jak przedstawiono wyżej, determinują badania nad modyfikacją pozyskiwanego β -(2,1)-fruktanu lub też doбором pozostałych czynników pozwalających wykorzystać natywny polimer. Selekcja szczepów probiotycznych o odpowiednio wysokim potencjale degradacyjnym pozwoliłaby z jednej strony wykorzystać wysoko spolimeryzowany lewan jako źródło węgla dla mikroflory bakteryjnej, a z drugiej strony ten sam polimer mógłby oddziaływać inhibująco w kierunku zmian nowotworowych jelit. Konieczne są jednak szeroko zakrojone badania *in vitro*, których wyniki zostaną potwierdzone w badaniach klinicznych.

Potencjalne zastosowanie lewanu

Rosnące zainteresowanie fruktanami wynika przede wszystkim z ich potencjalnie funkcjonalnych właściwości jako składników żywności [36]. Często sugerowana możliwość zastosowania FOS (fruktooligosacharydów, $3 \leq DP \leq 9$) jako słodzików, zamienników sacharozy jest kontrowersyjna [22]. Wynika to z faktu, że np. słodkość trisacharydu – kestozy wynosi 31 % słodkości sacharozy i zmniejsza się wraz z rosnącym łańcuchem fruktanu [37]. Ponadto, kaloryczność fruktanów nie powinna być pomijana, tj. stosownie po uwzględnieniu fermentacji bakteryjnej i resorpcji produktów fermentacji, dostępna energia wniesiona z fruktanem to 1 kcal/g kestozy, co stanowi około 40 %

energii odpowiadającej trzem heksozom [36]. Z niniejszych powodów porównywanie krótkołańcuchowych fruktanów ze słodzikami, takimi jak acesulfam K, aspartam, sacharyna i inne substancje intensywnie słodzące jest niewłaściwe, a odniesienie tych substancji do lewanu będącego polimerem nieuprawnione. Ze względu na niższe natężenie słodkości FOS mogą być stosowane w produkcji żywności jako składniki strukturotwórcze (efekt pęcznienia) w kombinacji ze słodzikami, czy też jako zamienniki tłuszczu. FOS analogicznie, jak poliole, np. mannitol (50-60 % słodkości sacharozy, 1,9 kcal/g) są tzw. wypełniaczami w pierwszej kolejności, a w drugiej można rozpatrywać je jako substytuty naturalnych substancji słodzących [51]. Lewan nie może być również rozpatrywany jako zamiennik sacharozy ze względu na wysoki stopień polimeryzacji, ponadto nie żeluje i rozważany jest generalnie jako polimer niepęczniący w wodzie, w temperaturze pokojowej [2]. Właściwości te zawężają zatem spektrum aplikacyjne natywnego lewanu. Jednakże produkcja nowych oligosacharydów z udokumentowanymi prebiotycznymi, fizjologicznymi i technologicznymi właściwościami wzrasta [37]. Wysoka masa cząsteczkowa lewanu predysponuje go w szczególności jako składnik żywności o strukturze emulsji, czynnik zagęszczający oraz stabilizujący [21].

Lewan jest surowcem, który według rozeznania autorów nie został jak dotychczas wdrożony do praktyki przemysłowej. Prowadzone są jednak prace aplikacyjne, uwzględniające m.in. potencjalne prozdrowotne oddziaływanie na organizm człowieka, jak i jego potencjał związany z cechami fizykochemicznymi.

Egzopolisacharydy produkowane w czasie fermentacji ciasta przez bakterie fermentacji mlekowej zakwasu chlebowego wpływają pozytywnie na reologiczne właściwości i końcową jakość chleba [1]. Bezpośrednią syntezę lewanu w fermentującym cieście chlebowym (zawierającym 9 % sacharozy) przeprowadzono z użyciem szczepu *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW, który wytwarzał 10,5 g kestozy oraz 2 g lewanu [42]. Jest to pierwsza jak dotychczas znana celowa synteza lewanu bezpośrednio w produkcji spożywczej.

Lewan wykorzystano m.in. do immobilizacji asparaginazy w skali laboratoryjnej. Założono, że naturalnie występujące glikoproteiny wykazują niezwykle wysoką stabilność dzięki niskiej wrażliwości na inaktywację cieplną i inne czynniki denaturujące. Charakteryzują się również wyższą stabilnością w płynach biologicznych w porównaniu z białkami nie zawierającymi grupy sacharydowej. Właściwości te wykorzystano w celu stabilizacji L-asparaginazy (E.C. 3.5.1.1.) z *Erwina carotovora*. Enzym ten wykorzystywany jest w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej. Przeprowadzono immobilizację L-asparaginazy, stosując lewan z *Zymomonas mobilis* o zróżnicowanej masie cząsteczkowej. Uzyskano wzrost aktywności enzymu w zakresie pH od 4,5 do 10, znacząco wyższą stabilność w podwyższonej temperaturze (40 i 50 °C) i jednocześnie wydłużono o miesiąc stabilność enzymu w wodnych roztwo-

rach, w porównaniu z jego formą natywną. Niekorzystny był natomiast wzrost stałej Michaelisa-Menten (1,5 – 4-krotny), szczególnie widoczny przy wykorzystaniu lewanu o wysokiej masie cząsteczkowej (200000 Da) [45].

Lewan ze względu na swoje właściwości, przede wszystkim fizyczne, może być szczególnie atrakcyjny jako surowiec do produkcji kosmetyków. Fruktan ten uważany jest za substancję nietoksyczną – dawki w przedziale od 50 do 3200 mg/kg nie wykazywały oznak toksyczności, czyniąc niemożliwym ustalenie wartości LD_{50} [9] – a ponadto jest łatwo zmywalny wodą. Główną zaletą lewanu w produkcji kosmetyków jest rozwiązanie problemu związanego z koniecznością długotrwałej adhezji kosmetyku do powierzchni skóry, ewentualnie włosów i jednocześnie z możliwością usunięcia z ciała najlepiej za pomocą ciepłej wody [34]. Wykazano także, że polimer ten wykazuje nawilżające i przeciwzapalne właściwości, a także działa podobnie jak kwas hialuronowy – pobudzając ludzkie fibroblasty i proliferację keranocytów [28].

Interesującą aplikacją, a wpisującą się w zakres prozdrowotnego oddziaływania lewanu na organizmy żywe są wstępne badania, w których zastosowano lewan jako immunomodulator w żywieniu narybku karpia (*Cyprinus carpio*). Lewan w stężeniu 0,5 % w masie paszy znacząco podwyższał liczbę erytrocytów i poziom hemoglobiny, natomiast liczba leukocytów, białka całkowitego, stosunek albumin do globulin nie różnił się istotnie od próby odniesienia. Fagocyty krwi i aktywność lizozymu były także wyższe. Przeżywalność narybku w kontakcie z *Aeromonas hydrophila* była najwyższa w hodowlach, w których stosowano w żywieniu lewan, co sugeruje, że fruktan ten ma działanie immunostymulacyjne dla *Cyprinus carpio* [35].

Indukowano również syntezę lewanu w tkankach roślinnych, aby uodpornić transgeniczne rośliny na niekorzystne warunki środowiskowe. W tym celu przeprowadzono ekspresję genu *SacB* w tytoniu. Syntetyzowany lewan miał przeciwdziałać czynnikom abiotycznym, głównie deficytowi wody wywołanemu suszą bądź niską temperaturą. Wydajny zbiór tytoniu zależy bowiem przede wszystkim od strategii adaptacyjnych roślin, włączając w to nagromadzenie substancji osmochronnych [27]. Podejmowano również próby akumulacji lewanu w transgenicznym tytoniu w celu produkcji tego wysokocząsteczkowego fruktanu w roślinach, jako alternatywy w kosztownej produkcji fruktozy na drodze izomeryzacji hydrolizatów skrobiowych, uzyskując zawartość lewanu między 3 a 8 % s.m. [17].

Podsumowanie

Lewan jako związek polisacharydowy o specyficznej strukturze, cechach fizycznych i chemicznych, a jednocześnie wciąż niedostatecznie udokumentowanym oddziaływaniu na organizmy żywe jest interesującym materiałem w zakresie zarówno badań podstawowych, jak i aplikacyjnych. Fruktan ten, zdaniem autorów, może stanowić alternatywę dla handlowych polisacharydów, przede wszystkim jako składnik żywno-

ści o znaczeniu prozdrowotnym. Zastosowanie lewanu w produktach żywnościowych lub w postaci suplementu diety wymaga wielu badań, które pozwolą ściśle określić jego atrybuty i wady. Zasadniczo rozwiązanie trzech głównych problemów pozwoliłoby zastosować lewan w produkcji żywności – wydajna synteza, udowodnione działanie prozdrowotne i wytyczony kierunek aplikacyjny.

Literatura

- [1] Arendt E.K., Ryan A.M., Bello F.D.: Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol.*, 2007, **24**, 165-174.
- [2] Arvidson S.A., Rinehart B.T., Gadala-Maria F.: Concentration regimes of solution of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydr. Polym.*, 2006, **65**, 144-149.
- [3] Bello F.D., Walter J., Hertel C., Hammes W.P.: *In vitro* study of probiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic Appl. Microbiol.*, 2001, **24**, 232-237.
- [4] Biedrzycka E., Bielecka M.: Prebiotic effectiveness of fructan of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci. Tech.*, 2004, **15**, 170-175.
- [5] Bielecka M., Biedrzycka E., Majakowska A.: Selection of probiotic and prebiotic for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res. Int.*, 2002, **35**, 125-131.
- [6] Bouhnik Y., Flourie B., D'Agay-Abensour L., Pochari P., Gramet G., Durand M., Rambaud J.-C.: Administration of trans-galacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies clonic fermentation metabolism in healthy humans. *J. Nutr.*, 1997, **127**, 444-448.
- [7] Bresolin T.M.B., Sander P.C., Reicher E., Sierakowski M.R., Rinaudo M., Ganter J.L.M.S.: Viscometric studies on xanthan and galactomannan systems. *Carbohydr. Polym.*, 1997, **33**, 131-138.
- [8] Calazans G.M.T., Lima R.C., de França F.P., Lopez C.E.: Molecular weight antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2000, **27**, 245-247.
- [9] Calazans G.M.T., Lopes C.E., Lima R.M.O.C., França F.P.: Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol. Lett.*, 1997, **1**, 19-21.
- [10] Carpita N.C., Housley T.L., Hendrix J.E.: New features of plant-fructan structure revealed by methylation analysis and carbon-13 NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 1991, **217**, 127-136.
- [11] Chronakis I.S., Doublier J.-L., Piculell L.: Viscoelastic properties for kappa- and iota-carrageenan in aqueous NaCl from the liquid-like to the solid-like behavior. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2000, **28**, 1-14.
- [12] Cieślak E., Proszak A., Pisulewski P.M.: Funkcjonalne właściwości fruktanów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **1 (26)**, 5-13.
- [13] Cummings J.H., Macfarlane G.R., Englyst H.N.: Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, **73 (Suppl.)**, 415S-420S.
- [14] Davis C.D., Milner J.A.: Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J. Nutr. Biochem.*, 2009, **20**, 743-752.
- [15] De Souza Oliveira R.P., Perego P., Converti A., De Oliveira M.N.: Growth and acidification performance of probiotic in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. *Food Sci. Technol.*, 2009, **42**, 1015-1021.
- [16] Diplock A.T., Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern E.B., Roberfroid M.B.: Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br. J. Nutr.*, 1999, **81 (Suppl)**, S1-S27.
- [17] Ebskamp M.J.M., Van der Meer I.M., Spronk B.A., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.M.: Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *Bio/Technol.*, 1994, **12**, 272-275.

- [18] Funami T., Kataoka Y., Omoto T., Goto Y., Asai I., Nishinari K.: Food hydrocolloids control the gelatinization and retrogradation behavior of starch. 2a. Functions of guar gums with different molecular weights on the gelatinization behavior of corn starch. *Food Hydrocol.*, 2005, **19**, 15-24.
- [19] Fric P.: Probiotic and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle. *Central Eur. J. Med.*, 2007, **2** (3), 237-270.
- [20] Gibson G.R., Roberfroid M.B.: Dietary modulation of the human clonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 1995, **125**, 1401-1412.
- [21] Han Y.W.: Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1990, **35**, 171-194.
- [22] Heyer A.G., Lloyd J.R., Kossmann J.: Production of modified polymeric carbohydrates. *Curr. Opin. Biotechn.*, 1999, **19**, 169-174.
- [23] Holzapfel W.H., Schillinger U.: Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.*, 2002, **35**, 109-116.
- [24] Howlett J.: Functional foods – from science to health and claims. ILSI Europe, Belgia 2009.
- [25] Jumel K., Harding S.E., Mitchell J.R., To K.-M., Hayter I., O'Mullane J.E., Ward-Smith S.: Molar mass and viscometric characterisation of hydroxypropylmethyl cellulose. *Carbohydr. Polym.*, 1996, **29**, 105-109.
- [26] Kang S.A., Hong K., Jang K.-H., Kim Y.-Y., Choue R., Lim Y.: Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *J. Nutr. Biochem.*, 2006, **17**, 419-426.
- [27] Konstantinova T., Parvanova D., Atanassov A., Djilianov D.: Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Sci.*, 2002, **163**, 157-164.
- [28] Kim K.H., Chung C.B., Kim Y.H., Kim K.S., Han C.S., Kim C.H.: Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmet. Sci.*, 2005, **56**, 395-406.
- [29] Leibovich J., Stark Y.: Increase of permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. *Cell. Mol. Biol.*, 1985, **31**, 337-341.
- [30] Marx S.P., Winkler S., Hartmeier W.: Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **182**, 163-169.
- [31] McKellar R.C., Modler H.W., Mullin J.: Characterization of growth and inulinase production by *Bifidobacterium* spp. on fructooligosaccharides. *Bifidobacteria Microflora.*, 1993, **12**, 75-86.
- [32] Muramatsu K., Onodera S., Kikuchi M., Shiomu N.: Substrate specificity and subsite affinities of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, **58**, 1642-1645.
- [33] Nilsson U., Dahlquist A., Nilsson B.: Cereal fructosans: Part 2. Characterization and structure of wheat fructosans. *Food Chem.*, 1986, **22**, 95-106.
- [34] *On-line* information – Montana Biotech SE, Inc., 1910-107 Lavington Court, Rock Hill, SC 29732, USA [www.polysaccharides.us].
- [35] Rairakhwada D., Pal A.K., Bhatena Z.P., Sahu N.P., Jha A., Mukherjee S.C.: Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immun.*, 2007, **22**, 477-486.
- [36] Roberfroid M., Gibson G.R., Delzenne N.: The biochemistry of oligofructose, an approach to calculate its caloric value. *Nutr. Rev.*, 1993, **51**, 137-146.
- [37] Sangeetha P.T., Ramesh M.N., Prapulla S.G.: Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, **16**, 442-457.
- [38] Suzuki A., Mitsuyama K., Koga H., Tomiyasu N., Masuda J., Takaki K., Tsuruta O., Toyonaga A., Sata M.: Bifidogenic growth stimulator for the treatment of active ulcerative colitis: a pilot study. *Nutrition*, 2006, **22**, 76-81.
- [39] Szwengiel A., Czarnecka M., Czarnecki Z.: Levan synthesis during associated action of levansucrase and *Candida cacaoi* DSM 2226 yeast. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2007, **57**, 433-440.

- [40] Szwengiel A., Czarnecka M., Roszyk H., Czarnecki Z.: Levam production by *Bacillus subtilis* DSM 347 strain. EJPAAU, 2004, **7**, <http://www.ejpau.media.pl/volume7/issue2/food/art-12.html>.
- [41] Szwengiel A., Gruchała L., Roszyk H., Czarnecka M., Czarnecki Z.: Studium syntezy lewanu, katalizowanej przez lewanosacharazy bakteryjne. Biotechnologia, 2009, **3 (86)**, 156-173 (w druku).
- [42] Tiekling M., Ehrmann M.A., Vogel R.F., Gänzle M.G.: Molecular and functional characterization of levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. Appl. Microbiol. Biot., 2005, **66**, 655-663.
- [43] Van Den Broek L.A.M., Voragen A.G.J.: *Bifidobacterium* glucoside hydrolases and (potential) prebiotic. Innovative Food Sci. Emerg. Technol., 2008, **9**, 401-407.
- [44] Vanloo J., Coussement P., Deleenheer L., Hoebregs H., Smits G.: On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1995, **35**, 525-552.
- [45] Vina I., Bekers K.M.: Stabilization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. J. Mol. Catal. B-Enzym., 2001, **11**, 551-558.
- [46] Yamamoto Y., Takahashi Y., Kawano M., Iizuka M., Matsumoto T., Sacki S., Yamaguchi H.: In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. J. Nutr. Biochem. 1999, **10**, 13-18.
- [47] Yamamoto Y., Takahashi Y., Kawano M., Iizuka M., Matsumoto T., Saeki S., Yamaguchi H.: Hypercholesterolemic effects of levan in rats. In: Nishinari K., (Ed.), Hydrocolloids (Part II). Elsevier Science, The Netherlands 2000, pp. 399-400.
- [48] Yazawa K., Imai K., Tamura Z.: Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by bifidobacteria. Chem. Pharm. Bull., 1978, **26**, 3306-3311.
- [49] Yoo S.H., Yoon E.J., Cha J., Lee H.G.: Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. Int. J. Biol. Macromol., 2004, **34**, 37-41.
- [50] Yoon E.J., Yoo S.H., Cha J., Lee H.G.: Effect of levan's branching structure on antitumor activity. Int. J. Biol. Macromol., 2004, **34**, 191-194.
- [51] Zduńczyk Z.: Odżywcze i zdrowotne właściwości substancji słodzących. W: Sacharydy i substancje słodzące – pod red. A. Rutkowskiego. Drukarnia Wydawnicza „Trans-Druk”, Konin 2002, ss. 39-55.

PROPERTIES AND APPLICATION OF LEVAN

Summary

Levan is a high-molecular, β -(2 \rightarrow 6)-linked fructose homo-polymer with the glucose residue bound to the terminal fructose by α -glycosidic bond. The knowledge of occurrence, biosynthesis, and properties of this fructan is extensive. Research results show a large potential for practical applications of levan and its hydrolysis products in the domain of food with pro-healthful properties. The main factors limiting the application of levan in diet is its availability and the lack of unambiguous data referring to the comprehensive impact of this fructan on human organism and/or on experimental animals. In this paper, a research into some indicators of pro-healthful impact of levan and levulans are presented. Possible applications of levan are also surveyed.

Key words: levan, prebiotic, SCFA, anti-tumour properties, functional properties ☒