

- KADEČKA, J., a ROZMAN, J. (2006): Chov skotu v proměnách času v Čechách se zaměřením na severovýchodní Čechy. ChovServis a.s., Hradec Králové, s. 124.
- KALOGIANNI, D. P. (2018): DNA-based analytical methods for milk authentication. *European Food Research and Technology*, 244, 5, s. 775-793.
- KRÁLÍČKOVÁ, Š., KUČTÍK, J., FILIPČÍK, R., LUŽOVÁ, T., ŠUSTOVÁ, K. (2013): Effect of chosen factors on milk yield, basic composition and somatic cell count of organic milk of Brown short-haired goats. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LXI, 1, s. 99-105.
- KUČTÍK, J. a SEDLÁČKOVÁ, H. (2003): Composition and properties of milk in white short-haired goats on the third lactation. *Czech Journal of Animal Science*, 48, 12, s. 540-550.
- KVAPILÍK, J., BUČEK, P., KUČERA, J. et al. (2019): Chov skotu v České republice. Ročenka 2018. ČMSCH a.s. Praha, s. 78.
- LEVIEUX, D., VENIEN, A. (1994): Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. 61, 1, s. 91-99. Published online by Cambridge University Press: 01 June 2009. DOI: 10.1017/S0022029900028089
- MARTÍNEZ DE LA VARA, J. A., HIGUERA, A. G., ESTEBAN, M. R., ASENSIO, J. R., DELGADO, M. C., BERRUGA, I., MOLINA, A. (2018): Monitoring bulk milk quality by an integral traceability system of milk. *Journal of Applied Animal Research*, 46, 1, s. 784-790.
- MILLÁN-VERDÚ, C., GARRIGÓS-OLTRA, L., BLANES-NADAL, G., DOMINGO-BELTRÁN, M. (2003): The History of Optical Analysis of Milk: The Development and Use of Lactoscopes. *Journal of Chemical Education*, 80, 7, s. 762-767.
- NICOLAOU, N., XU, Y., GOODACRE, R. (2010): Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science*, 93, 12, s. 5651-5660. doi: 10.3168/jds.2010-3619
- NOVOTNÁ, L., KUČTÍK, J., DOBEŠ, K., ŠUSTOVÁ, K., ZAJÍČOVÁ, P. (2007): Effect of somatic cell count on ewe's milk composition, its properties and quality of rennet curdling. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LV, 2, s. 59-64.
- ORAVCOVÁ, M., MAHUČOVÁ, L., TANČIN, V. (2018): The relationship between somatic cells and milk traits, and their variation in dairy sheep breeds in Slovakia. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 27, s. 97-104.
- PLOCKOVÁ, M. a HORÁČKOVÁ, Š. (2019): Aktuální pohled na pasteraci mléka. Current view on milk pasteurization. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 30, 174, 3, s. 7-9. (In Czech)
- PSATHAS, G. a TZAMALOUKAS, O. (2017): Novel analytical technologies of Quality in the Sheep and Goat Dairy Sector. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 5, 2, ISSN: 2348-9790, s. 1-10. <http://www.annexpublishers.com/articles/JVSAH/5205-Novel-analytical-technologies-of-Quality-in-the-Sheep-&-Goat-Dairy-Sector.pdf>
- RAYNAL-LJUTOVAC, K., PARK, Y. W., GAUCHERON, F., BOUHALLAB, S. (2007): Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, s. 207-220.
- SANTOS, P. M., PEREIRA-FILHO, E. R., RODRIGUEZ-SAONA, L. E. (2013): Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 138, 1, s. 19-24. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.024
- SOJKOVÁ, K., HANUŠ, O., ŘÍHA, J., GENČUROVÁ, V., HULOVÁ, I., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J. (2010 a): Impacts of lactation physiology at higher and average yield on composition, properties and health indicators of milk in Holstein breed. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 1, ISSN 1211-3174, s. 21-28.
- SOJKOVÁ, K., HANUŠ, O., ŘÍHA, J., YONG, T., HULOVÁ, I., VYLETĚLOVÁ, M., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J. (2010 b): A comparison of lactation physiology effects at high and lower yield on components, properties and health state indicators of milk in Czech Fleckvieh. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 2, ISSN 1211-3174, s. 84-91.
- TSAKALI, E., AGKASTRA, C., KOLIAKI, C., LIVANIOS, D., BOUTRIS, G., CHRISTOPOULOU, M. I., KOULOURIS, S., KOUSSISSIS, M., VAN IMPE, J. F. M., HOUBOU, D. (2019): Milk Adulteration: Detection of Bovine Milk in Caprine Dairy Products by Real Time PCR. *Journal of Food Research*, 8, 4, ISSN 1927-0887, s. 52-57.
- ZACHAR, P., ŠOLTÉS, M., KASARDA, R., NOVOTNÝ, J., NOVÍKMECOVÁ, M., MARCINČÁKOVÁ, D. (2011): Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mlékarstvo*, 61, 3, s. 199-207.

**Korespondující autor:** Dr. Ing. Oto Hanuš,  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6, e-mail: hanus.oto@seznam.cz

Přijato do tisku: 20. 10. 2020

Lektorováno: 10. 11. 2020

## DLOUHODOBÉ PŘEŽÍVÁNÍ *LISTERIA MONOCYTOGENES* V MLÉKÁRENSKÝCH PROVOZECH

**Mgr. Gelbíčová Tereza, Ph.D.,  
Ing. Hlucháňová Lucie, Mgr. Kalová Alžběta,  
Doc. MVDr. Karpíšková Renáta, Ph.D.**  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

### Long-term survival of *Listeria monocytogenes* in dairy plants

#### Abstrakt

Bakterie *Listeria monocytogenes* se vyznačují rozsáhlou schopností environmentální adaptace, která přispívá k jejich přežívání v prostředí potravinářských provozů, šíření v potravinovém řetězci a vzniku listerióz u spotřebitelů. Cílem této studie bylo srovnání diverzity genomu suspektně perzistentních kmenů *L. monocytogenes* ze sýrařských podniků za využití metody celogenomového sekvenování (WGS). Výsledky studie potvrdily, že metoda WGS je vhodným nástrojem umožňujícím poskytnout manažerům potravinářských podniků informace o výskytu perzistentních kmenů bakterií dlouhodobě znehodnocujících kvalitu a bezpečnost jejich výrobků.

**Klíčová slova:** perzistence, sýry, celogenomové sekvenování, prostředí potravinářských podniků

#### Abstract

*Listeria monocytogenes* are characterized by an extensive ability of environmental adaptation, which contributes to their survival in the environment of food processing plants, spread in the food chain and the development of listeriosis in consumers. The aim of this study was to compare the genome diversity of suspected persistent *L. monocytogenes* strains from cheese processing plants using whole genome sequencing (WGS). The results of the study confirmed that the WGS method is a suitable tool to provide food business managers with

information on the presence of persistent strains of bacteria that in long term decrease the quality and food safety of their products.

**Key words:** persistence, cheeses, whole genome sequencing, environment of food processing plants

## Úvod

Schopnost bakterií přežívat a růst delší období v konkrétním prostředí se označuje jako perzistence a je determinována na základě opakované izolace klonálně příbuzných kmenů nalezených např. v nemocnicích nebo potravinářských provozech (Carpentier a Cerf, 2011; Ferreira a kol., 2014). V praxi je však obtížné rozlišit, zda se jedná o opakovaný výskyt sledovaného bakteriálního kmene (vstupujícího do potravinářského podniku se surovinami), nebo se jedná o perzistentní kmen dlouhodobě přizpůsobený podmínkám daného provozu a vykazující klonální podobnost (Ferreira a kol., 2014). Molekulární mechanismy perzistence bakterií stále nejsou dobře prozkoumány. Dlouhodobé přežívání specifických klonů bakterií v prostředí potravinářských podniků však může podporovat jejich vyšší tolerance k podmínkám vnějšího prostředí, jako je nedostatek živin, nízké pH, vysoká osmolarita, teplotní šok, přítomnost konkurenčních mikroorganismů nebo schopnost tvorby biofilmu.

*Listeria monocytogenes* je známá svojí schopností perzistovat v prostředí potravinářských podniků i po dobu několika let (Stessl a kol., 2014), což může vést ke kontaminaci finálních výrobků a následně i vzniku listerióz u rizikových skupin spotřebitelů (gravidní ženy, imunokompromitovaní jedinci, senioři). *L. monocytogenes* u těchto rizikových skupin populace vyvolává závažné onemocnění s převážně alimentární cestou přenosu, zahrnující septikémie a neurologické, či neonatální infekce. Listeriózou v České republice ročně onemocní asi 30-40 osob, závažná je však vysoká smrtnost pacientů (20-35 %).

*L. monocytogenes* je možné považovat za geneticky heterogenní druh, jenž se dělí do řady klonálních komplexů (CCs). Ty zahrnují skupiny blízké příbuzných sekvenačních typů (STs) se specifickým výskytem a charakteristikou. V současnosti se lze setkat s rozdělením *L. monocytogenes* na hypervirulentní klony, kam patří kmény klonálního komplexu 1 (CC1), CC2, CC4 a CC6, s tropismem zejména k humánním a animálním hostitelským buňkám, a na hypovirulentní klony CC121 a CC9 spojované především s výskytem v potravinách a perzistencí v potravinářských podnicích (Maury a kol., 2019).

Pro provozovatele potravinářských provozů je nezbytné provádění monitoringu výrobního prostředí za účelem sledování zdrojů a cest šíření nežádoucích bakterií a omezení možných rizik plynoucích z kontaminace finálních výrobků. Nedílnou součástí sledování výskytu *L. monocytogenes* v prostředí výroby je využívání vhod-

ných typizačních metod umožňujících odhalení kmenů adaptovaných na specifické podmínky potravinářských provozů. Určení CCs a STs metodou MLST (multilocus sequence typing) může poskytnout prvotní informaci o výskytu suspektně perzistentních kmenů, ale neumožňuje analýzu klonální příbuznosti kvůli nízké diskriminační síle. Metoda celogenomového sekvenování (WGS) umožňuje současně identifikaci identických klonů *L. monocytogenes* perzistujících ve výrobě a detekci genetických determinant podílejících se na jejich adaptaci a schopnosti dlouhodobého přežití v potravinářských provozech. V současnosti neexistují žádná pravidla týkající se diferenciací perzistentních a neperzistentních kmenů na základě analýzy dat WGS. K potvrzení výskytu perzistentních kmenů *L. monocytogenes* v potravinářských provozech je využívána SNPs (single nucleotide polymorphisms) analýza (Fagerlund a kol., 2016; Knudsen a kol., 2017), ale také core genome (cg)MLST (Palma a kol., 2017).

V naší studii jsme se zaměřili na porovnání charakteristik kmenů *L. monocytogenes* izolovaných ve třech mlékárenských podnicích po dobu několika let. S použitím metody celogenomového sekvenování byly charakterizovány genomy bakterií a byla provedena analýza jejich příbuznosti.

## Materiál a metody

### Testované kmény *L. monocytogenes*

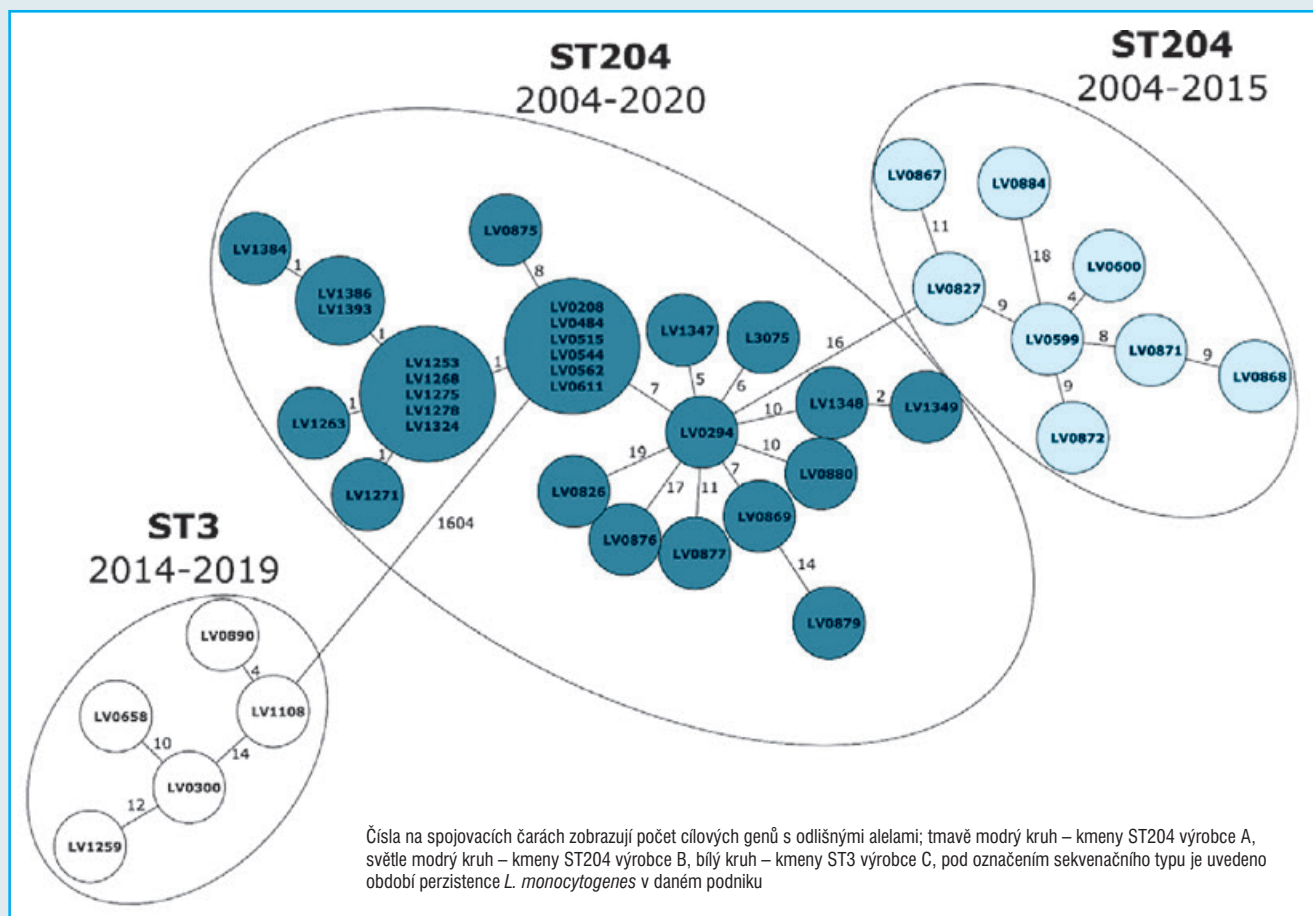
Celkem bylo analyzováno 41 perzistentních kmenů *L. monocytogenes* pocházejících z výroby zrajících sýrů s plísní (n=28), sýrů zrajících pod mazem (n=8) a pařených sýrů (n=5). Období, ve kterém byly perzistentní kmény jednotlivých potravinářských podniků získány, uvádí Tabulka 1. Kmény byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu (-75 °C) a před extrakcí DNA pro celogenomové sekvenování byly kultivovány na krevním agaru při 37 °C 24 ± 2 h za aerobních podmínek.

### Celogenomové sekvenování (whole genome sequencing - WGS)

Genomická DNA byla izolována pomocí kitu Blood and Tissue dle instrukcí výrobce (Qiagen, Hilden, Německo). Příprava DNA knihoven a samotná sekvenace na platformě Illumina (San Diego, Kalifornie, USA) byla provedena externě s využitím sekvenátorů MiSeq (n=27) a NextSeq (n=14).

### Analýza genomu

Hrubá sekvenanční data byla asemblována pomocí Velvet verze 1.1.04 softwaru Ridom SeqSphere+ (verze 6.0.2; Ridom GmbH, Münster, Germany). Klonální příbuznost testovaných kmenů byla porovnána pomocí softwaru Ridom SeqSphere+ na základě cgMLST s využitím schématu (1701 cílových alel) dle studie Ruppitsch a kol., (2015).



**Obr. 1** Klonální příbuznost perzistentních kmenů *L. monocytogenes* na základě cgMLST analýzy (Ridom SeqSphere+ MST (Minimum Spanning Tree) based on 1701 columns, pairwise ignoring missing values)

## Výsledky a diskuze

### Zařazení perzistentních kmenů *L. monocytogenes* k sekvenčnímu typu

V průběhu let 2004 až 2020 byly získány perzistentní kmeny *L. monocytogenes* ( $n=41$ ) ze tří sýrařských podniků. U výrobce A zaměřeného na výrobu zrajících sýrů s plísní byla prokázána perzistence *L. monocytogenes* po dobu až 16 let. Rovněž v dlouhodobě sledovaném potravinářském podniku B vyrábějícím sýry zrající pod mazem *L. monocytogenes* perzistovala více jak 10 let. U obou výrobců zrajících sýrů (A, B) byly získané kmeny *L. monocytogenes* serotypu 1/2a zařazené ke stejnému sekvenčnímu typu (ST204). U výrobce pařených sýrů patřily kmeny *L. monocytogenes* k serotypu 1/2b a sekvenčnímu typu ST3 (Tabulka 1).

Korelace mezi perzistencí *L. monocytogenes* a specifickými sekvenčními typy není jednoznačná a může být geograficky značně rozdílná, přestože jsou v potravinářských podnicích často popisovány zejména perzistentní kmeny ST121 a ST9 (Stessl a kol., 2014). V Rakousku byly identifikovány jako nejlépe adaptované kmeny *L. monocytogenes* schopné perzistovat v mlékárenských podnicích po dobu až několika let kmeny ST14 a ST121 (Kaszoni-Rückerl a kol., 2020). V Dánsku byly v různých potravinářských podnicích nejčastěji

detekovány perzistentní kmeny ST7, ST8 a ST121 (Knudsen a kol., 2017). Sekvenční typ ST204, který byl v této studii detekován u dlouhodobě perzistujících kmenů *L. monocytogenes* dvou českých mlékárenských podniků, patří v Austrálii mezi nejčastější skupinu listerií izolovaných z různých typů potravinářských prostředí, potravin, ale i klinických případů humánních listerióz (Fox a kol., 2016).

### Určení klonální příbuznosti perzistentních kmenů na základě cgMLST

Na základě cgMLST byla potvrzena klonální příbuznost mezi kmeny *L. monocytogenes* izolovanými v rámci specifických potravinářských podniků (Obr. 1). U kmenů ST204 perzistujících v potravinářských podnicích po dobu více jak deseti let byly kmeny *L. monocytogenes* navzájem rozdílné maximálně v 19 alelách u výrobce A a v rozmezí 4 až 18 rozdílných alel u výrobce B. U kmenů ST3 izolovaných z pařených sýrů různých šarží balených u výrobce C byly během pěti let zjištěny rozdíly mezi kmeny jen v rozmezí 4 až 14 alel. Zatímco při epidemiologických šetřeních hromadných případů listerióz se při hodnocení příslušnosti kmene *L. monocytogenes* do epidemického klastru na základě cgMLST využívá mezní hodnota  $\leq 10$  rozdílných alel (Ruppitsch a kol., 2015) nebo  $\leq 7$  rozdílných alel (Moura a kol., 2016) dle

použitého schématu, pro hodnocení perzistentního klastru listerií toto kritérium nelze využít. Ani při šetření epidemií jediná mezní hodnota nemůže striktně predikovat, zda jsou izoláty epidemiologicky příbuzné a WGS data nemohou být interpretována izolovaně od dat epidemiologických (Jackson a kol., 2016). Rozdíly v počtu alel mezi jednotlivými kmeny *L. monocytogenes* v této studii mohly být ovlivněny jednak metodickým přístupem (např. dlouhodobým skladováním kmenů, podmínkami vlastní sekvenace na různých platformách a metodami analýzy dat), ale také evolucí bakterií v prostředí daného potravinářského podniku v průběhu několika let.

Kmeny *L. monocytogenes* ST204 výrobce A i B vykazovaly na základě cgMLST vysokou podobnost, oba klastry se od sebe lišily pouze 16 alelami (Obr. 1). To potvrzuje fakt, že stabilita genomu *L. monocytogenes* může vést k vysoké klonální příbuznosti mezi izoláty z různých zpracovatelských závodů a regionů, díky čemuž se obtížně dohledává zdroj těchto kmenů (Knudsen a kol., 2017). Australská studie prokázala analýzou genomu kmenů *L. monocytogenes* ST204 z různých zdrojů vysoce konzervovaný „core genome“. Diverzitu mezi kmeny představovala zejména přítomnost mobilních genetických elementů, jako jsou plasmidy, transpozony a fágové inserce (Fox a kol., 2016).

## Závěr

Poprvé byly v ČR metodou celogenomového sekvenování analyzovány kmeny *L. monocytogenes* z prostředí potravinářských provozů, finálních výrobků odebraných u výrobce a výrobků po expedici v tržní síti. Analýza sekvenčních dat potvrdila klonální příbuznost mezi kmeny *L. monocytogenes* vždy v rámci daného provozu výroby zrajících a pařených sýrů. Jednotlivé kmeny se v rámci jednoho podniku mohou v čase měnit, na základě cgMLST však nevykazovaly větší rozdíly než 19 alel. Kritéria pro hodnocení příbuznosti bakteriálních kmenů používaná při šetření epidemií jsou při hodnocení příbuznosti persistentních kmenů z potravin příliš přísná a pro hodnocení situace v potravinářských podnicích a potravinách je nutné stanovit volnější rozpětí. Studie přinesla nové poznatky v oblasti potravinářské výroby a mikrobiologické bezpečnosti potravin využitelné pro výrobce potravin i orgány státní správy, zabezpečující dozor nad potravinami.

## Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektů MZE RO0520 a NAZV QK1910121.

## Literatura

CARPENTIER B., CERF O. (2011): Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.*, 145, s. 1-8.

FAGERLUND A., LANGSRUD S., SCHIRMER B.C.T., MØRETRØ T., HEIR E. (2016): Genome analysis of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 strains persisting in salmon and poultry processing environments and comparison with related strains. *Plos One*, 11, e0151117.

**Tab. 1** Původ a charakteristika testovaných perzistentních kmenů *L. monocytogenes*

Výrobce	Typ výroby	Období izolace	Zdroj izolace	n	Sérotyp	MLST
A	zrající sýry s plísni	2004 - 2020	prostředí výroby	23	1/2a	ST204
			finální výrobky	5	1/2a	ST204
B	zrající sýry pod mazem	2004 - 2015	prostředí výroby	1	1/2a	ST204
			finální výrobky	7	1/2a	ST204
C	pařený sýr	2014 - 2019	finální výrobky	5	1/2b	ST3

n = počet testovaných kmenů

FERREIRA V., WIEDMANN M., TEIXEIRA P., STASIEWICZ M.J. (2014): *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J. Food Prot.*, 77, s. 150-170.

FOX E. M., ALLNUTT T., BRADBURY M.I., FANNING S., CHANDRY P.S. (2016): Comparative genomics of the *Listeria monocytogenes* ST204 subgroup. *Front. Microbiol.*, 7, 2057.

JACKSON B.R., TARR C., STRAIN E., JACKSON K.A., CONRAD A., CARLETON H., KATZ L.S., STROIKA S., GOULD L.H., MODY R.K., SILK B.J., BEAL J., CHEN Y., TIMME R., DOYLE M., FIELDS A., WISE M., TILLMAN G., DEFIBAUGH-CHAVEZ S., KUCEROVA Z., SABOL A., ROACHE K., TREES E., SIMMONS M., WASILENKO J., KUBOTA K., POUSEELE H., KLIMKE W., BESSER J., BROWN E., ALLARD M., GERNER-SMIDT P. (2016): Implementation of nationwide real-time whole-genome sequencing to enhance listeriosis outbreak detection and investigation. *Clin. Infect. Dis.*, 63, s. 380-386.

KASZONI-RÜCKERL I., MUSTEDANAGIC A., MURI-KLINGER S., BRUGGER K., WAGNER K.H., WAGNER M., STESSL B. (2020): Predominance of distinct *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in recurrent contamination events at dairy processing facilities. *Microorganisms*, 8, 234.

KNUDSEN G.M., NIELSEN J.B., MARVIG R.L., NG Y., WORNING P., WESTH H., GRAM L. (2017): Genome-wide analyses of *Listeria monocytogenes* from food-processing plants reveal clonal diversity and date the emergence of persisting sequence type. *Environ. Microbiol. Rep.*, 9, s. 428-440.

MAURY M.M., BRACQ-DIEYE H., HUANG L., VALES G., LAVINA M., THOUVENOT P., DISSON O., LECLERCQ A., BRISSE S., LECUIT M. (2019): Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat. Commun.*, 10, 2488.

MOURA A., CRISCUOLO A., POUSEELE H., MAURY M.M., LECLERCQ A., TARR C., BJÖRKMAN J.T., DALLMAN T., REIMER A., ENOUF V., LARSONNEUR E., CARLETON H., BRACQ-DIEYE H., KATZ L.S., JONES L., TOUCHON M., TOURDJMAN M., WALKER M., STROIKA S., CANTINELLI T., CHENAL-FRANCISQUE V., KUCEROVA Z., ROCHA E. P. C., NADON C., GRANT K., NIELSEN E.M., POT B., GERNER-SMIDT P., LECUIT M., BRISSE S. (2016): Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Microbiol.*, 2, 16185.

PALMA F., PASQUALI F., LUCCHI A., DE CESARE A., MANFREDA G. (2017): Whole genome sequencing for typing and characterisation of *Listeria monocytogenes* isolated in a rabbit meat processing plant. *Ital. J. Food Saf.*, 6, s. 125-130.

RUPPITSCH W., PIETZKA A., PRIOR K., BLETZ S., FERNANDEZ H. L., ALLERBERG F., HARMSSEN D., MELLMANN A. (2015): Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, 53, s. 2869-2876.

STESSL B., FRICKER M., FOX E., KARPISKOVA R., DEMNEROVA K., JORDAN K., EHLING-SCHULZ M., WAGNER M. (2014): Collaborative survey on the colonization of different types of cheese-processing facilities with *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.*, 11, s. 8-14.

**Korespondující autor:**

Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 70, 621 00 Brno, e-mail: karpiskova@vri.cz

*Přijato do tisku: 3. 11. 2020*

*Lektorováno: 10. 11. 2020*

## ENZYMOVÁ SYNTÉZA GALAKTOOLIGOSACHARIDŮ Z LAKTOSY

**Ladislav Čurda, Monika Kumherová, Jiří Štětina**

*Ústav mléka, tuků a kosmetiky,*

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*

### Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from lactose

#### Abstrakt

Enzymová syntéza galaktooligosacharidů (GOS) z laktosy je založena na transgalaktosylační aktivitě  $\beta$ -galaktosidasy. V článku jsou shrnuty dosavadní poznatky o enzymové přípravě GOS. Kromě podmínek reakce je pozornost zaměřena především na způsoby aplikace enzymu (volný a imobilizovaný enzym, celé a permeabilizované buňky, hrubé buněčné extrakty, membránové reaktory). Stručně jsou popsány kroky průmyslové výroby a možnosti aplikace GOS.

**Klíčová slova:** galaktooligosacharidy,  $\beta$ -galaktosidasa, laktosa, prebiotika, transgalaktosylace

#### Abstract

The enzymatic synthesis of galactooligosaccharides (GOS) from lactose is based on the transgalactosylation activity of  $\beta$ -galactosidase. The paper summarizes the existing knowledge about the enzymatic preparation of GOS. In addition to the reaction conditions, attention is focused mainly on the methods of enzyme application (free and immobilized enzyme, whole and permeabilized cells, crude cell extracts, membrane reactors). The steps of industrial production and the possibilities of GOS application are briefly described.

**Keywords:** galactooligosaccharides,  $\beta$ -galactosidase, lactose, prebiotics, transgalactosylation

#### Úvod

Galaktooligosacharidy (GOS) jsou nestravitelné oligosacharidy s význačnými prebiotickými vlastnostmi. Galaktooligosacharidy jsou obvykle definovány jako

směs látek získaných z laktosy, které obsahují 3 až 10 monosacharidových jednotek. Jedna z těchto jednotek je obvykle terminální glukosa a zbývající jednotky tvoří galaktosa, ke GOS patří i disacharidy tvořené dvěma jednotkami galaktosy. Stavební monosacharidy jsou v GOS vázané obvykle vazbami  $\beta$  1-6 a  $\beta$  1-4, méně často  $\beta$  1-3 a  $\beta$  1-2. Kromě prebiotické funkce je známa stimulace absorpce vápníku a dalších minerálních látek (Whisner a kol., 2013), z dalších fyziologických funkcí je často uváděna prevence zácpy, rakoviny tlustého střeva nebo ovlivnění imunity. GOS jsou bezbarvé, mírně sladké (30 – 40 % sladivosti sacharosy). Jsou stále při vysokých teplotách i v kyselém prostředí. S aplikačními možnostmi GOS ve funkčních potravinách souvisí setrvale rostoucí zájem v oblasti výzkumu. Podle databáze Web of Science byly v 90. letech až do r. 2008 jen jednotlivé práce věnované GOS, v dalších letech se počet prací pohyboval kolem 15 a od r. 2017 je to 25 – 30 publikovaných článků. Roste také objem výroby GOS – v. r. 2020 se očekává produkce kolem 176 000 t s ročním růstem 6,1 % v letech 2021 – 2026 (More, 2020).

#### Enzymy a substráty používané pro syntézu GOS

Galaktooligosacharidy lze sice připravit i chemickou syntézou, mnohem výhodnější je však využití enzymové katalýzy. Pro enzymovou syntézu GOS je teoreticky možné využít enzymy ze skupiny glykosyltransferas (EC 2.4), ale jejich praktickému využití brání omezená dostupnost enzymu a potřeba aktivace galaktosy na UDP galaktosu. Z těchto důvodů se pro přípravu GOS využívá prakticky výhradně transgalaktosylační aktivita  $\beta$ -galaktosidas (E.C. 3.2.1.), která byla zjištěna v 50. letech minulého století. GOS tohoto typu jsou někdy také označovány jako transgalaktooligosacharidy (TOS) pro odlišení od přirozeně se vyskytujících galaktooligosacharidů, např. v mléce. Pro výrobu GOS v průmyslovém měřítku je dostupný jen omezený počet komerčních  $\beta$ -galaktosidas. Pro neutrální oblast pH jsou využívány enzymy z kvasinek *Kluyveromyces* sp. (Maxilact, Lactozym, Ha-lactase, Godo, Amano), z bakterie *Bacillus circulans* (Bioactase), v kyselé oblasti enzym z plísní *Aspergillus niger* (Maxilact A4) nebo z *A. oryzae* (Lactaid, Validase), v širším rozmezí pH jsou použitelné geneticky modifikované enzymy z bifidobakterií (Saphe-ra, Nola Fit). Uvedené enzymy se však využívají především v technologii výrobků s hydrolyzovanou laktosou a jsou k dispozici v různé aktivitě a čistotě. Použitý enzym je pak hlavním faktorem, který určuje jaké GOS a v jakém množství budou vznikat.

Pro laboratorní přípravu je nejvhodnějším substrátem koncentrovaný roztok laktosy v pufru, lze tak snadno kontrolovat přítomné ionty. V jiných substrátech může totiž být aktivita enzymu těmito ionty pozitivně i negativně ovlivněna. V průmyslovém měřítku lze využít permeát po ultrafiltraci syrovátky, syrovátku i mléko nebo podmáslí (Čurda a kol., 2006).