

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 β -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, β -galaktosidasa, laktosa, prebiotika, transgalaktosylace

Abstract

The enzymatic synthesis of galactooligosaccharides (GOS) from lactose is based on the transgalactosylation activity of β -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, β -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 β 1-6 a β 1-4, méně často β 1-3 a β 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 β -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 β -galaktosidas. Pro neutrální oblast pH jsou využívány enzymy z kvasinek *Kluyveromyces* sp. (Maxilact, Lactozym, Ha-lactase, Godo, Amano), z bakterie *Bacillus circulans* (Bio-lactase), 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).

Podmínky reakce

Koncentrace laktosy (respektive aktivita vody) je zásadním parametrem, který ovlivňuje výsledné množství GOS. Při koncentraci do 10 % laktosy převažuje hydrolytická aktivita β -galaktosidasy, transgalaktosylační aktivita převažuje při koncentraci 30 %, při vyšších koncentracích se výtěžek GOS mění jen málo (Guerrero a kol., 2015; Torres a kol., 2010). Optimální pH a teplota pro syntézu GOS se obvykle příliš neliší od optimálních podmínek daného enzymu, i když podle některých autorů může být mírně ovlivněno zastoupení jednotlivých GOS. Optimální hodnota pH pro kvasinkové a některé bakteriální enzymy je 6 až 7, pro enzymy izolované z plísní 2,5 až 4,5. Možnost použití vysoké teploty je výhodná s ohledem na nízkou rozpustnost laktosy i udržení růstu případné kontaminace pod kontrolou. Enzymy z *Aspergillus niger* a *A. oryzae* jsou krátkodobě stabilní i při teplotě 65 °C, β -galaktosidasa kvasinek při 50 °C (Guerrero a kol., 2015), déle trvající reakce jsou však obvykle prováděny při teplotě o 5 až 15 °C nižší. Existují rovněž enzymy hypertermofilních bakterií stabilní i při 95 °C. V přítomnosti bílkovin však může být za vysoké teploty na závalu vyšší reaktivita přítomných monosacharidů. Dalším podstatným faktorem je stupeň hydrolyzy laktosy, protože při vysokém stupni hydrolyzy laktosy dochází také k hydrolyze vzniklých GOS, např. pro enzym Maxilact je optimální stupeň hydrolyzy kolem 70 % (Čurda a kol., 2006). To značně komplikuje přípravu preparátů s vysokým obsahem GOS, protože zbytková laktosa se hůře odstraňuje z reakční směsi. Výtěžky GOS se za optimálních podmínek reakce obvykle pohybují od 20 do 40 g na 100 g laktosy (Torres a kol., 2010).

Produkce GOS s využitím volného enzymu

Aplikace volného enzymu je z hlediska provedení nejjednodušší, nevýhodou je ve srovnání s imobilizovaným enzymem vysoká spotřeba enzymu a nutnost jeho tepelné inaktivace, aby se zabránilo hydrolyze již vzniklých GOS. K inaktivaci komerčně dostupných β -galaktosidas dochází již při pasteračních teplotách, imobilizace mírně zvyšuje termostabilitu enzymů. Samotné GOS jsou stabilní i při vyšších teplotách a v širokém rozsahu pH. Pro dosažení minimální koncentrace laktosy a monosacharidů lze využít kombinace enzymů (Botvynko a kol., 2019). Při kombinaci kvasinkového enzymu Maxilact LGI 5000 a enzymu NOLA Fit nebo Saphera (původem z *Bifidobacterium bifidum*) konečný obsah laktosy tvořil pouze 1 % z výchozího množství, výtěžek GOS byl 22 %. Nejvyšší výtěžek 30 % byl získán kombinací enzymu Maxilact A4 MG (z *Aspergillus oryzae*) a Maxilact LGI 5000, kdy však zbytkový obsah laktosy byl 10krát vyšší. Studií s aplikací volných enzymů je celá řada, v poslední době např. Mano a kol. (2019) použili jako substrát obnovený permeát syrovátky s koncentrací laktosy 30 % a enzym Lactozyme 2600 L (z *Kluyveromyces lactis*) a dosáhli výtěžku GOS 25 %.

Použití hrubých buněčných extraktů

Komerční preparáty β -galaktosidasy jsou poměrně nákladné, řešením by pro hydrolyzu laktosy i syntézu GOS mohlo být použití hrubých buněčných extraktů bakterií mléčného kvašení (Vasiljevic a Jelen, 2003). Hlavní operací při přípravě extraktu je rozbití buněk mechanickým způsobem (ultrazvuk, vysokotlaký homogenizátor, mikrofluidizér, French press, kuličkový mlýn), fyzikálně (osmotický šok), chemicky (rozpuštědla, povrchově aktivní látky) nebo lytickými enzymy (Geciová a kol., 2002). Tyto extrakty pochopitelně obsahují i další enzymy, což může negativně ovlivňovat vlastnosti a kvalitu produktů. Proveditelnost z ekonomického hlediska záleží na výsledném produktu (Bury a Jelen, 2000), pro produkty s nízkou cenou, jako je glukoso-galaktosový sirup, není postup výhodný, avšak pro GOS by jej patrně bylo možné použít.

Imobilizace β -galaktosidasy

Hlavní výhodou imobilizovaných enzymů je jejich opakované použití a tedy úspora enzymu, je možná kontinuální produkce, enzym není nutné inaktivovat a omezí se rovněž inhibiční působení monosacharidů, které vykazuje většina β -galaktosidas (Vera a kol., 2011). Literární údaje nejsou jednotné v hodnocení vlivu imobilizace na produkci GOS, přesto některé aplikace se zdají být nadějně. Eskandarloo a Abbaspourrad (2018), kteří imobilizovali β -galaktosidasu z *Aspergillus oryzae* na skleněné kuličky, dosáhli v permeátu syrovátky výtěžku 39,3 %. Imobilizovat lze i celé buňky, např. Yu a O'Sullivan (2018) získali pomocí buněk *Lactococcus lactis* imobilizovaných na chitosan 150 g L⁻¹ GOS.

Membránový reaktor

Membránový reaktor má podobné výhody jako imobilizovaný enzym, odpadá obvykle náročný proces imobilizace, kdy může docházet ke ztrátě části enzymu. Enzym je zadržován vhodnou ultrafiltrační membránou, substrát proto musí obsahovat jen nízkomolekulární látky, které nebudou zadržovány. Je nutné optimalizovat podmínky reakce, zejména dobu zdržení v reaktoru v závislosti na koncentraci substrátu a dávce enzymu. Množství získaných GOS je obvykle v reaktoru poněkud nižší než ze vsádkového postupu, např. Pcedičová a kol. (2010) použila Maxilact LX 5000 (6 U mL⁻¹) a permeát syrovátky s obsahem laktosy 20 %. Při vsádkové reakci bylo koncentrace získaných GOS 25,5 g L⁻¹, v membránovém reaktoru při době zdržení 45 min 16,7 g L⁻¹.

Využití celých a permeabilizovaných buněk pro syntézu GOS

Podobně jako v případě buněčných extraktů tento postup umožňuje vyhnout se nákladné izolaci čistého enzy-

mu. Zajímavé je využití kvasinek, které mohou využívat monosacharidy, zvýší se tak čistota GOS. Vznikají tak ale další metabolity (např. ethanol nebo kyselina octová) a součástí produktu zůstávají i složky média, i když lze použít také čistý roztok laktosy (Aburto a kol., 2016). Je možné použít buňky v klidovém stavu, buněčná stěna však tvoří bariéru, která snižuje reakční rychlost. Lepší přístup k substrátu umožňují permeabilizované buňky. Ze srovnání volného enzymu a permeabilizovaných buněk vyplývá, že transgalaktosylační aktivita permeabilizovaných buněk je vyšší (Rodriguez-Colinas a kol., 2011). Permeabilizace buněk je poměrně jednoduchá a spočívá v kontaktu buněk s rozpouštědlem, nejčastěji ethanol, který je vhodný z hlediska dalšího použití buněk pro potravinářské účely.

Průmyslová výroba GOS

Průmyslová výroba GOS obvykle vychází z koncentrovaného roztoku laktosy nebo permeátu syrovátky, následuje enzymová reakce některým z výše popsaných postupů. Po reakci však směs obsahuje značné množství monosacharidů a nezreagované laktosy, proto obvykle následuje purifikační krok. Ten může být založený na ošetření aktivním uhlím, vylučovací nebo kation výměnné chromatografii, nanofiltraci nebo na již zmíněném fermentačním způsobu. Velcí výrobci využívají kontinuální chromatografii s pohyblivým ložem (SMB). Purifikace může zahrnovat odbarvení a demineralizaci. Komerční produkty jsou ve formě sirupu nebo prášku a obsahují obvykle 30 až 70 % GOS v sušině. Nejznámější komerční produkty jsou Vivinal (Friesland Foods Domo, Nizozemsko) a Oligomate (Yakult Honsha, Japonsko). K významným výrobcům dále patří Nissin Sugar Co. Ltd., Japonsko (Cup Oligo), Ingredion Inc., Korea (Biologo) a Clasado Bioscience Ltd., V. Británie (Bimuno).

Závěr

Galaktoligosacharidy nacházejí uplatnění zejména ve funkčních potravinách a kojenecké výživě, v pečivu a cukrovinkách. GOS lze také použít jako prebiotickou složku místo fruktooligosacharidů ve fermentovaných výrobcích, výsledný produkt pak obsahuje pouze mléčné složky. Enzymová příprava galaktoligosacharidů představuje perspektivní technologii, která může přispět k významnému zhodnocení laktosy, která je k dispozici v obrovském množství v syrovátce po výrobě sýrů a v permeátu po získání koncentráту bílkovin syrovátky. V současné době se výzkum syntézy GOS zaměřuje na nové enzymy, jejichž struktura je cíleně modifikována, dále na enzymy extrémofilních mikroorganismů, které jsou aktivní při nízkých nebo naopak vysokých teplotách. Genetická informace těchto nových enzymů je obvykle přenesena do jiného produkčního mikroorganismu. Další oblastí, které je věnována pozornost, je hledání efektivních postupů pro získání GOS s maximálním výtěžkem a čistotou.

Poděkování

Tato práce byla vytvořena za finanční podpory Ministerstvem zemědělství ČR (program ZEMĚ, projekt QK1910024)

Literatura

- ABURTO C., GUERRERO C., VERA C., WILSON L., ILLANES A. (2016): Simultaneous synthesis and purification (SSP) of galacto-oligosaccharides in batch operation. *LWT - Food Sci. Technol.*, 72, s. 81-89.
- BOTVYNKO A., BEDNÁŘOVÁ A., HENKE S., SHAKHNO N., ČURDA L. (2019): Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial β -galactosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 517, s. 762-766.
- BURY D., JELEN P. (2000): Lactose hydrolysis using a disrupted dairy culture: Evaluation of technical and economical feasibility. *Canad. Agric. Eng.*, 42, s. 75-80.
- ČURDA L., RUDOLFOVÁ J., ŠTĚTINA J., DRYÁK B. (2006): Dried butter-milk containing galactooligosaccharides - process layout and its verification. *J. Food Eng.*, 77, s. 468-471.
- DELGADO-FERNÁNDEZ P., CORZO N., OLANO A., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ O., MORENO F. J. (2019): Effect of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria and physicochemical properties of yoghurts. *Int. Dairy J.*, 89, s. 77-85.
- GUERRERO C., VERA C., CONEJEROS R., ILLANES A. (2015): Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme Microb. Technol.*, 70, s. 9-17.
- MANO M.C.R., PAULINO B.N., PASTORE G.M. (2019): Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Res. Int.*, 124, s. 78 - 85.
- MORE A.: *Galacto Oligosaccharides (GOS) Market - Research Report 2020-2026* (on line). Staženo 29. 9. 2020. Dostupné z: https://www.theexpresswire.com/pressrelease/Galacto-Oligo-saccharides-GOS-Market-Size-2020-Research-by-Business-Opportunities-Top-Manufacture-Future-Growth-Industry-Share-Report-Regional-Analysis-and-Global-Forecast-to-2026_11714979.
- POCEDIČOVÁ K., ČURDA L., MIŠÚN D., DRYÁKOVÁ A., DIBLÍKOVÁ L. (2010): Preparation of galacto-oligosaccharides using membrane reactor. *J. Food Eng.*, 99, s. 479 - 484.
- RODRIGUEZ-COLINAS B., DE ABREU M.A., FERNANDEZ-ARROJO L., DE BEER R., POVEDA A., JIMENEZ-BARBERO J., HALTRICH D., OLMO A.O., FERNANDEZ-LOBATO M., PLOU F.J. (2011): Production of Galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *J. Agric. Food Chem.*, 59, s. 10477-10484
- TORRES D.P., GONÇALVES M.D.P.F., TEIXEIRA J.A., RODRIGUES L.R. (2010): Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 9, s. 438-454.
- VASILJEVIC T., JELEN P. (2003): Oligosaccharide production and proteolysis during lactose hydrolysis using crude cellular extracts from lactic acid bacteria. *Lait*, 83, s. 453-467.
- VERA C., GUERRERO C., ILLANES A., CONEJEROS R. (2011): A pseudo steady-state model for galacto-oligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 108, s. 2270-2279.
- WHISNER C.M., MARTIN B.R., SCHOTERMAN M.H., NAKATSU C.H., MCCABE L.D., MCCABE G.P. (2013): Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: a double-blind cross-over trial. *Br. J. Nutr.*, 110, s. 1292-303.
- YU L., O'SULLIVAN D.J. (2018): Immobilization of whole cells of *Lactococcus lactis* containing high levels of a hyperthermostable β -galactosidase enzyme in chitosan beads for efficient galacto-oligosaccharide production. *J. Dairy Sci.*, 101, s. 2974-2983.

Korespondující autor: doc. ing. Ladislav Čurda, CSc.,
Ústav mléka, tuků a kosmetiky VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6,
e-mail: Ladislav.Curda@vscht.cz

Přijato do tisku: 3. 11. 2020

Lektorováno: 18. 11. 2020