

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Hydrolýza laktosy v mléce a syrovátce za  
katalýzy  
 $\beta$ -galaktosidasy**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Veronika Saporová**  
Studijní program: B1406 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **doc.RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: 13.5.2013

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 13.5.2013

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat paní doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce a cenné rady, které mi byly během psaní této práce poskytnuty. Dále děkuji panu doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za pomoc při práci s HPLC. Mé poděkování patří také Mgr. Miroslavu Jořenkovi a Mgr. Kristýně Pospíškové především za pomoc při práci v laboratoři.

### **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Veronika Saparová
Název práce	Hydrolýza laktosy v mléce a syrovátce za katalýzy $\beta$ -galaktosidasy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce Rok obhajoby práce	doc.RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D. 2013
Abstrakt	Tato bakalářská práce se zabývá imobilizací $\beta$ -galaktosidasy a jejím využitím při hydrolýze laktosy v syrovátce. Teoretická část se zabývá vlastnostmi $\beta$ -galaktosidy. Pojednává o struktuře, zdrojích, substrátové specifitě a také inhibici $\beta$ -galaktosidasy. Další kapitola se zabývá možnostmi stanovení laktosy a stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy. Experimentální část se soustředí na imobilizaci $\beta$ -galaktosidasy na tři různé typy nosičů. Zaměřuje se také na hydrolýzu laktosy v syrovátce a na studium možnosti opakovaného použití imobilizované $\beta$ -galaktosidasy při hydrolýze syrovátky. Studium hydrolýzy laktosy v syrovátce bylo provedeno metodou HPLC.
Klíčová slova	Laktosa, $\beta$ -galaktosidasa, hydrolýza, imobilizace
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český

### **Bibliographical identification:**

Autor's first name and Surname	Veronika Saparová
Title	Hydrolysis of lactose in milk and whey catalyzed $\beta$ -galactosidase
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc.RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>This bachelor thesis deals with the immobilization of <math>\beta</math>-galactosidase and its use in the hydrolysis of lactose in whey. The theoretical part deals with the properties of <math>\beta</math>-galactoside. It discusses the structure, resources, substrate specificity and inhibition of <math>\beta</math>-galactosidase. The next chapter deals with possibilities of determination of lactose and determination of <math>\beta</math>-galactosidase activity. The experimental part focuses on the immobilization of <math>\beta</math>-galactosidase for three different types of carriers. It also focuses on the hydrolysis of lactose in whey and on study the possibility of repeated use of immobilized <math>\beta</math>-galactosidase for hydrolysis of whey. Study of the hydrolysis of lactose in whey was done by HPLC method.</p>
Keywords	Lactose, $\beta$ -galactosidase, hydrolysis, immobilization
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

<b>1. Cíle práce .....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>2. Úvod.....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>3. Teoretická část.....</b>	<b>- 10 -</b>
3.1. Laktosa .....	- 10 -
3.1.1. Vlastnosti laktosy .....	- 10 -
3.1.2. Intolerance laktosy.....	- 13 -
3.2. $\beta$ -galaktosidasa.....	- 14 -
3.2.1. Zdroje a vlastnosti $\beta$ -galaktosidasy .....	- 14 -
3.2.2. Struktura $\beta$ -galaktosidasy .....	- 18 -
3.2.3. Hydrolýza laktosy.....	- 19 -
3.3. Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy.....	- 20 -
3.3.1. Historie imobilizace enzymů .....	- 21 -
3.3.2. Metody imobilizace .....	- 22 -
3.4. Metody stanovení laktosy.....	- 28 -
3.4.1. Titrační metody .....	- 29 -
3.4.2. Biochemické metody .....	- 30 -
3.4.3. Instrumentální metody.....	- 30 -
3.5. Metody stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy.....	- 33 -
<b>4. Experimentální část.....</b>	<b>- 34 -</b>
4.1. Materiály .....	- 34 -
4.2. Přístroje .....	- 35 -
4.3. Metody .....	- 36 -
4.3.1. Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy na mikročástice Perlosa MG 100.....	- 36 -
4.3.2. Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy na nanočástice $\text{Fe}_3\text{O}_4$ obalené chitosanem ...	- 36 -
4.3.3. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy.....	- 37 -
4.3.4. Stanovení vazebné kapacity $\beta$ -galaktosidasy .....	- 37 -
4.3.5. Hydrolýza laktosy v syrovátce $\beta$ -galaktosidasou .....	- 38 -
4.3.6. Operační stabilita imobilizované $\beta$ -galaktosidasy.....	- 39 -
4.3.7. HPLC analýza vzorků syrovátky.....	- 39 -
4.3.8. SDS-PAGE elektroforéza $\beta$ -galaktosidasy.....	- 40 -
4.4. Výsledky a diskuze.....	- 41 -
4.4.1. Porovnání účinnosti imobilizace $\beta$ -galaktosidasy na různých nosičích .....	- 41 -
4.4.2. Vazebná kapacita $\beta$ -galaktosidasy.....	- 42 -
4.4.3. Hydrolýza laktosy v syrovátce $\beta$ -galaktosidasou .....	- 43 -
4.4.3. Operační stabilita imobilizované $\beta$ -galaktosidasy.....	- 46 -

4.4.4. SDS-PAGE elektroforéza $\beta$ -galaktosidasy.....	- 48 -
<b>5. Závěr.....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>7. Použité zkratky.....</b>	<b>- 58 -</b>

# 1. Cíle práce

- Vypracovat literární řešení na téma: Hydrolýza laktosy v mléce a syrovátce za katalýzy  $\beta$ -galaktosidasy.
- Připravit imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasu na různých typech nosičů.
- Pomocí metody HPLC studovat hydrolýzu laktosy v syrovátce.



## 2. Úvod

S rostoucím výskytem intolerance laktosy u dospělé populace se zvyšuje poptávka po bezlaktosovém mléce a mléčných výrobcích. Enzym  $\beta$ -galaktosidasa [E.C.3.2.1.23] je hydrolytický enzym, který štěpí glykosidovou vazbu laktosy a rozkládá ji tak na dvě její stavební podjednotky - glukosu a galaktosu. Nepřítomnost tohoto enzymu nebo jeho nízká produkce v lidském organismu vyvolávají nepříjemné symptomy po požití potravin obsahujících laktosu a způsobují sníženou schopnost organismu tyto potraviny trávit a laktosu metabolizovat. Řešením je dodržování bezlaktosové diety, která musí obsahovat pouze bezlaktosové potraviny.

Z ekologického hlediska je velkým problémem nadměrná produkce syrovátky při výrobě sýra. Tato syrovátka je vypouštěna do vodních toků a způsobuje jejich závažné znečištění. Řešením je hydrolýza laktosy v syrovátce, která přemění syrovátku na sladký sirup složený z glukosy a galaktosy. Tento sirup může být následně využit v potravinářském průmyslu při výrobě sladkých nápojů a potravin.

Enzymová hydrolýza laktosy  $\beta$ -galaktosidasou je finančně náročný proces. Cena tohoto procesu však může být snížena imobilizací  $\beta$ -galaktosidasy na vhodné nosiče, jelikož se umožní opakované použití enzymu.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Laktosa

Laktosa je zajímavý sacharid v mnoha ohledech. U placentárních savců je syntetizován prsní žlázou v pozdním stádiu těhotenství a během laktace. Syntéza laktosy je umožněna enzymem laktosasyntasou. Laktosasyntasa je dimerický komplex dvou proteinů, a to galaktosyltransferasy a  $\alpha$ -laktalbuminu (Garret & Grisham, 2010). Tabulka 1 ukazuje rozdílné složení mléka různých savců, včetně rozdílného zastoupení laktosy.

**Tab. 1: Složení mléka různého původu (v %), (Upraveno podle:Latha, 2007).**

Druh mléka	Voda	Bílkoviny	Tuk	Laktosa	Popel
Kravské	87,4	3,3	3,9	4,6	0,72
Lidské	86,5	2,0	4,1	7,2	0,21
Kozí	86,9	3,3	4,5	4,6	0,79
Kobylí	89,8	2,0	1,5	6,1	0,41
Tulení	34,0	12,0	54,0	neobsahuje	0,53

#### 3.1.1. Vlastnosti laktosy

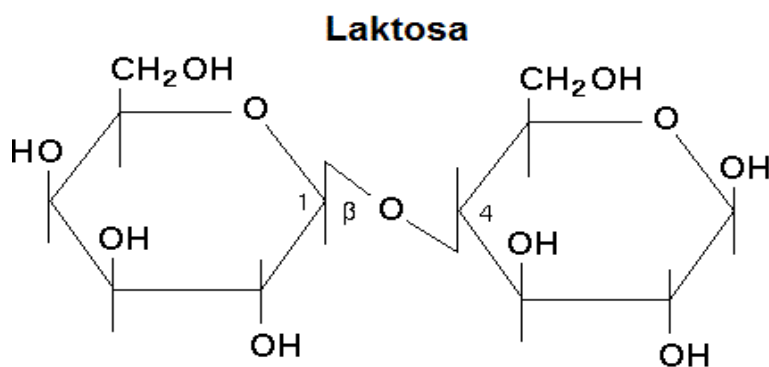
Laktosa je disacharid, který se vyskytuje v mléčných výrobcích. Proto se také laktosa označuje názvem mléčný cukr. Laktosa je hlavní složkou syrovátkové sušiny (okolo 70 %) a je velmi důležitým zdrojem energie. Má také několik významných funkcí, jako jsou stimulace peristaltické aktivity v zažívacím traktu, ovlivnění absorpce vápníku a fosforu, dále také zajištění optimálního množství hořčíku a zlepšení trávení mléčného tuku a dalších živin v lidském organizmu. Jako první izoloval laktosu Ettmueller v roce 1688, a to rekrystalizací ze syrovátky (Whittier, 1944).

**Tab. 2: Obsah laktosy v mléčných výrobcích** (Upraveno podle: Stránský et al., 2007).

Mléčný výrobek (100g)	Množství laktosy
Polotučný jogurt	5 g
Odtučněné mléko	5 g
Švýcarský sýr	1 g
Zmrzlina	1,9 g
Cottage sýr	2–3 g
Máslo	6 g
Kozí sýr	4,1 g
Kefír	4 – 6 g
Ovčí sýr	0,1 g

### 3.1.1.1. Struktura laktosy

Laktosa je redukující sacharid o molární hmotnosti  $342,3 \text{ g mol}^{-1}$ , jehož sumární vzorec je  $\text{C}_{12}\text{O}_{22}\text{H}_{11}$ . Jedná se o disacharid. Disacharidy jsou složené sacharidy, ve kterých jsou dva monosacharidy navzájem spojeny vazbou mezi anomerním centrem jedné jednotky a libovolnou hydroxylovou skupinou druhé jednotky. Laktosa se skládá z D-glukosy a D-galaktosy. Tyto dva monosacharidy jsou vázány  $\beta$ -glykosidovou vazbou mezi C1 galaktosy a C4 glukosy. Laktosa je tedy (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glykosid. Konkrétně  $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glukopyranosa nebo také 4-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl- $\beta$ -D-glukopyranosa (McMurry, 2007). Struktura laktosy je znázorněna na obrázku 1.

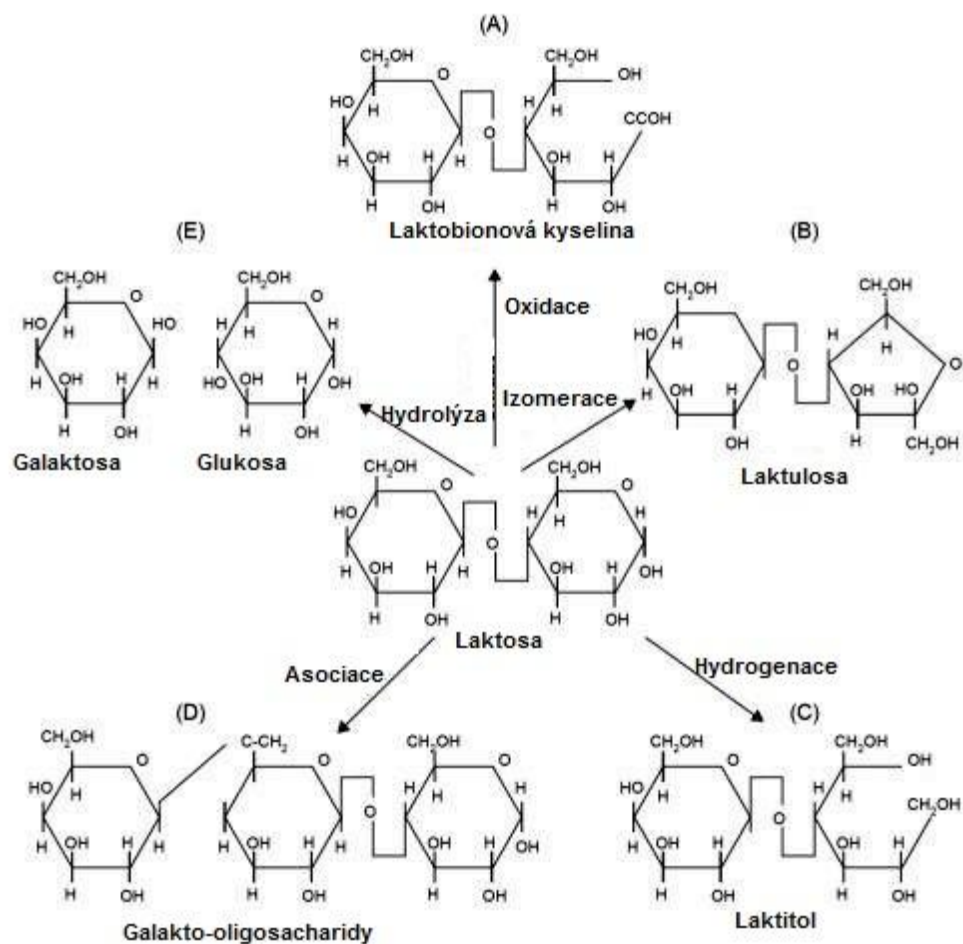


**Obr. 1: Struktura laktosy** (Upraveno podle: Fasciotti et al., 2012).

C1 uhlík glukosy je anomerní, což způsobuje existenci dvou forem laktosy,  $\alpha$ -laktosy a  $\beta$ -laktosy. Obě tyto formy mají stejné chemické vlastnosti, liší se však vlastnostmi fyzikálními. Například optická otáčivost  $\alpha$ -laktosy je  $+89,4^\circ$ , zatímco optická otáčivost  $\beta$ -laktosy je  $+35,0^\circ$  (Brown et al., 2009).

### 3.1.1.2. Chemické reakce laktosy

Laktosa může za určitých podmínek podléhat například hydrolýze, oxidaci, redukcí, izomeraci nebo také asociaci. Při oxidaci se laktosa oxiduje na kyselinu laktobionovou. Při redukcí se laktosa redukuje na alkohol laktitol. Z biotechnologického hlediska je však nejdůležitější reakcí hydrolýza laktosy. Chemické reakce laktosy jsou schematicky znázorněny na obrázku 2.



**Obr. 2: Reakce laktosy** (Upraveno podle: Jovanovic-Malinovska et al., 2012; Gutierrez et al., 2012).

Hydrolýza laktosy se může provádět působením minerálních kyselin, pomocí ionexů nebo působením  $\beta$ -galaktosidasy.

### 3.1.2. Intolerance laktosy

Intolerance laktosy je neschopnost trávit větší množství laktosy. Je způsobena nedostatkem enzymu laktasy, který je produkován buňkami lemujícími stěnu tenkého střeva. Často dochází k záměně intolerance laktosy s nesnášenlivostí kravského mléka, jelikož příznaky jsou často velice podobné. Nesnášenlivost kravského mléka je alergická reakce, která je vyvolána imunitním systémem, zatímco intolerance laktosy je problém, který je způsoben trávicím systémem (Klouda, 2000; Hejtmánková et al. 2002).

Symptomy intolerance laktosy jsou nevolnost, křeče, nadýmání, plynatost a průjem. Tyto symptomy se obvykle dostavují po 30 minutách až 2 hodinách od požití potravin nebo nápojů obsahujících laktosu. Závažnost těchto symptomů závisí na mnoha faktorech jako jsou množství laktosy, kterou je člověk ještě schopen tolerovat, dále věk člověka, rasa a rychlost zažívání.

Intoleranci laktosy může být těžké diagnostikovat. Lékař nejdříve doporučí pacientovi vyloučení kravského mléka ze stravy. Pokud příznaky nezmizí, udělá lékař testy, které diagnostikují intoleranci laktosy. Mezi nejběžnější testy patří Test tolerance laktosy. Tento test vyžaduje hladovění a následné vypití nápoje, který obsahuje laktosu. Po dobu 2 hodin je poté odebráno několik vzorků krve, ve kterých se stanovuje obsah glukosy. Tato měření ukazují, jak dobře je tělo schopné trávit laktosu. Pokud hladina glukosy v krvi pacienta nestoupá, znamená to, že tělo není schopné štěpit laktosu (Klouda, 2000; Hejtmánková et al., 2002).

Některé příčiny nesnášenlivosti laktosy jsou dobře známy. Primární deficit laktasy je stav, který se vyvíjí v průběhu času. Ve věku 2 let tělo začne produkovat méně laktasy, přičemž si většina lidí nepříjemných symptomů povšimne, až když jsou starší. K sekundárnímu nedostatku laktasy dochází při poranění tenkého střeva nebo při některých trávicích onemocněních, které snižují množství laktasy, kterou člověk produkuje. Mezi tato onemocnění patří například celiakie, zánětlivé onemocnění střev a Crohnova choroba. Vědci dokonce identifikovali genetický odkaz pro nesnášenlivost laktosy. Někteří lidé se rodí s pravděpodobností vzniku primárního deficitu laktasy, jelikož jim byla tato predispozice předána geneticky například od rodičů. Tento objev

může být užitečný při vývoji diagnostického testu, který dokáže identifikovat lidi s touto predispozicí.

Intoleranci laktosy je lehké léčit. Neexistuje sice léčba, která by dokázala zvýšit schopnost těla vytvářet laktasu, ale nepříjemné symptomy mohou být velmi dobře udržovány pod kontrolou dodržováním bezlaktosové diety (Shortt & O'Brien, 2004).

## 3.2. $\beta$ -galaktosidasa

$\beta$ -D-galaktosidasa (EC.3.2.1.23), častěji známá jako laktasa, je hydrolytický enzym, který katalyzuje hydrolýzu laktosy na glukosu a galaktosu (Verma et al., 2012).

### 3.2.1. Zdroje a vlastnosti $\beta$ -galaktosidasy

Enzym může být získán z různorodých zdrojů, jakými jsou například mikroorganismy, rostliny nebo živočichové.  $\beta$ -galaktosidasu je možné vyizolovat z rostlinných pletiv a živočišných tkání. Nejčastěji se však  $\beta$ -galaktosidasa získává z mikroorganismů. Vyskytuje se v bakteriích, kvasinkách, plísních a aktinomycetách. Vlastnosti, specifičnost a struktura  $\beta$ -galaktosidasy se liší podle zdroje, ze kterého enzym pochází. Enzymy se liší například v molekulové hmotnosti, polohou aktivního místa, délkou aminokyselinového řetězce, stabilitou a také *pH* optimem a teplotním optimem (Mlichová & Rosenberg, 2006; Verma et al., 2012). Vlastnosti mikrobiálních  $\beta$ -galaktosidas jsou znázorněny v tabulce 3.

**Tab. 3: Vlastnosti mikrobiálních  $\beta$ -galaktosidas.** E=extracelulární, I=intracelulární (Upraveno podle: Mlichová & Rosenberg, 2006).

Vlastnosti mikrobiálních $\beta$ -galaktosidas				
	Mikroorganismus	Produkce enzymu	$pH$ optimum	Teplotní optimum [°C]
Plísně	<i>Aspergillus niger</i>	E	3,0 - 4,0	55-60
	<i>Aspergillus oryzae</i>	E	5,0	50-55
Kvasinky	<i>Kluyveromyces lactis</i>	I	6,5 - 7,0	30-35
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	I	6,6	30-35
Bakterie	<i>Escherichia coli</i>	I	7,2	40
	<i>Lactobavillus thermophilus</i>	I	6,2	55
	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	I	6,5	66
	<i>Bacillus circulans</i>	I	6,0	65

V porovnání s rostlinnými a živočišnými zdroji  $\beta$ -galaktosidas jsou mikrobiální zdroje výhodnější především díky vyššímu výtěžku, což snižuje cenu enzymu a jsou proto technologicky více významné (Grossová et al., 2008).

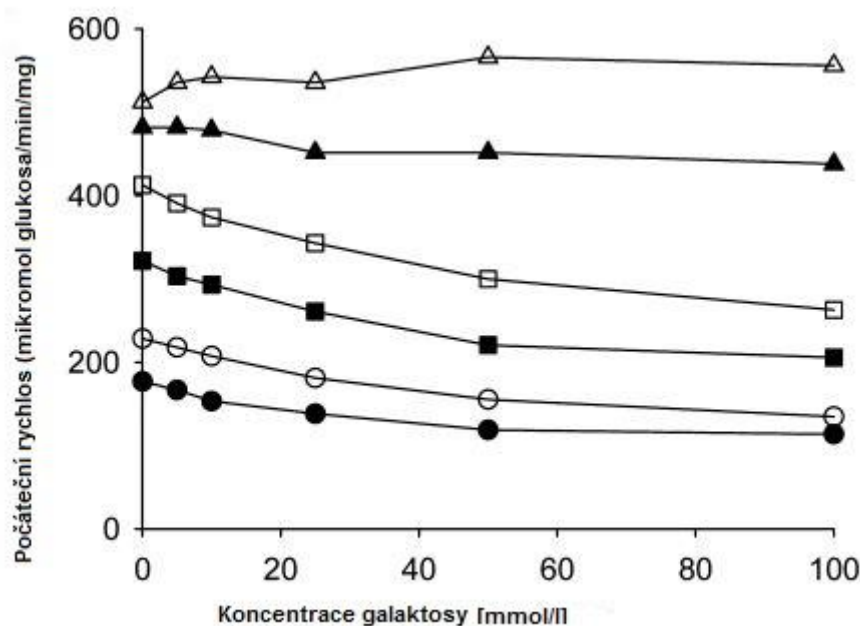
Výběr vhodného zdroje  $\beta$ -galaktosidas závisí na reakčních podmínkách hydrolýzy laktosy. Například mléčné kvasinky s  $pH$  optimem kolem 6,5-7 jsou používány při enzymové hydrolýze laktosy v mléce a syrovátce, zatímco plísňová  $\beta$ -galaktosidasa s  $pH$  optimem kolem 3-5 je více využívána při kyselé hydrolýze laktosy v syrovátce (Mlichlová & Rosenberg, 2006).

Ustok et al. (2010) vyšetřovali  $pH$  optimum a teplotní optimum  $\beta$ -galaktosidas. Zjistili, že optimální  $pH$   $\beta$ -galaktosidas je 7. Toto zjištění odpovídá výsledkům dřívějších experimentů, kdy například Greenberg & Mahoney (1982) stanovili  $pH$  optimum 7,0 pro  $\beta$ -galaktosidasu izolovanou z bakterie *S.thermophilus*. Podobného objevu dosáhli také Kreft & Jelen (2000), (Ustok et al., 2010).

Dále Ustok et al. (2010) zjistili, že teplotní optimum  $\beta$ -galaktosidas se nachází v rozpětí teplot 45-50°C. V rozmezí těchto teplot si enzym udržel 90 % své původní aktivity (Ustok et al., 2010). Podobného výsledku dosáhli také Shah & Jelen (1991), kteří stanovili jako teplotní optimum  $\beta$ -galaktosidasy teplotu 45°C (Shah & Jelen, 1991).

Kim et al. (2004) zkoumali inhibiční efekt galaktosy na  $\beta$ -galaktosidasu. Zjistili, že galaktosa působí jako inhibitor  $\beta$ -galaktosidasy pouze při určité koncentraci laktosy

jako substrátu. Při koncentraci laktosy pod 50 mmol l<sup>-1</sup> fungovala galaktosa jako silný inhibitor β-galaktosidasy. Při koncentraci laktosy kolem 100 mmol l<sup>-1</sup> však začal inhibiční efekt galaktosy mizet a při koncentraci laktosy nad 200 mmol l<sup>-1</sup> dokonce začala působením galaktosy aktivita β-galaktosidasy stoupat (Kim et al., 2004). Vliv galaktosy na aktivitu β-galaktosidasy je znázorněn na obrázku 3.

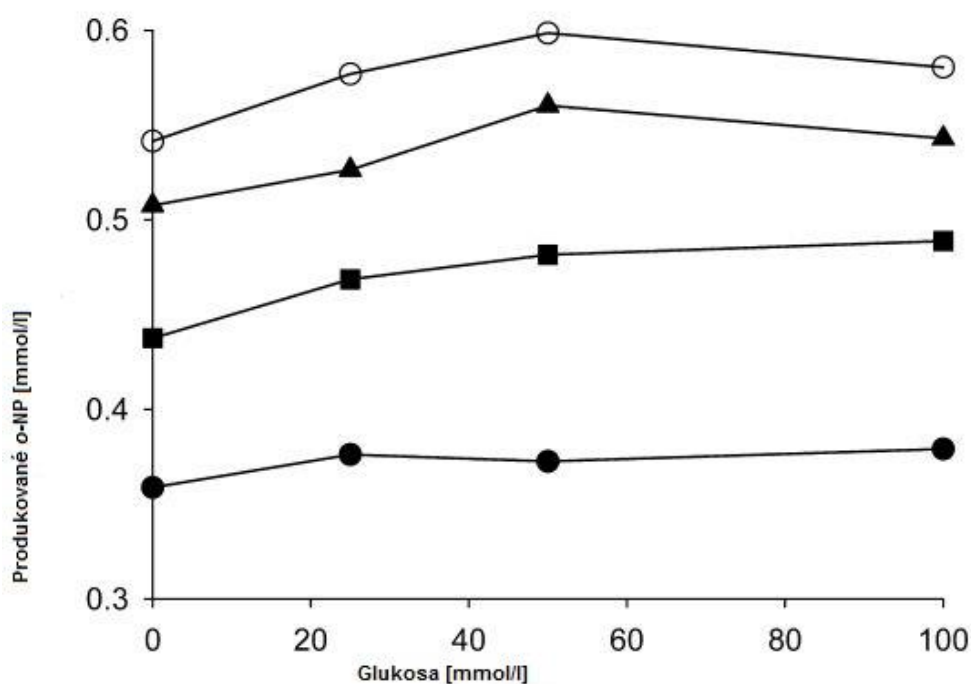


**Obr. 3: Efekt galaktosy na aktivitu β-galaktosidasy.** Graf znázorňuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci galaktosy. Byla použita různá koncentrace galaktosy (0, 5, 10, 25, 50 a 100 mmol l<sup>-1</sup>) a různá koncentrace laktosy (10 mmol l<sup>-1</sup> = černé kolečko, 15 mmol l<sup>-1</sup> = bílé kolečko, 25 mmol l<sup>-1</sup> = černý čtverec, 50 mmol l<sup>-1</sup> = bílý čtverec, 100 mmol l<sup>-1</sup> = černý trojúhelník, 200 mmol l<sup>-1</sup> = bílý trojúhelník), (Upraveno podle: Kim et al., 2004).

Kim et al. (2004) také zkoumali inhibiční efekt glukosy na β-galaktosidasu. Jako substrát použili oNPG místo laktosy, protože laktosu v tomto případě není možné použít. Důvodem je závažný vliv laktosy na stanovení aktivity β-galaktosidasy po přidání glukosy do reakční směsi. Se zvyšující se koncentrací glukosy se zvyšovalo množství produkovaného o-NP, zatímco snížení aktivity β-galaktosidasy bylo pozorováno při vysoké koncentraci o-NPG (více než 10 mmol l<sup>-1</sup>) a glukosy (více než 50 mmol l<sup>-1</sup>). Tyto výsledky naznačují, že glukosa není inhibitorem hydrolýzy, ale chová se jako lepší akceptor pro transgalaktosylační reakce a reaguje pouze s meziproduktem reakce (galaktosyl-enzym) jako akceptor galaktosy, čímž vytváří



galaktosyl-glukosový disacharid (Kim et al., 2004). Obrázek 4 znázorňuje vliv glukosy na aktivitu  $\beta$ -galaktosidasy.



**Obr. 4: Efekt glukosy na aktivitu  $\beta$ -galaktosidasy.** Graf znázorňuje závislost množství vzniklého o-NP na množství přidané glukosy. Byly použity různé koncentrace glukosy (0, 25, 50 a 100 mmol l<sup>-1</sup>). Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla studována při použití o-NPG jako substrátu o různých koncentracích (2,5 mmol l<sup>-1</sup> = černé kolečko, 5 mmol l<sup>-1</sup> = černý čtverec, 10 mmol l<sup>-1</sup> = černý trojúhelník a 15 mmol l<sup>-1</sup> = bílé kolečko), (Upraveno podle: Kim et al., 2004).

Během několika posledních let se zvyšuje zájem o enzymy, které jsou vysoce aktivní při nízkých, či naopak vysokých teplotách. Fernandes et. al (2002) izolovali  $\beta$ -galaktosidasu z psychrotrofního mikroorganismu *Pseudoalteromonas* sp. z prostředí Antarktidy. Enzym byl purifikován s vysokým výtěžkem. Rychlá purifikace zahrnovala extrakci ve vodném dvoufázovém systému doprovázenou hydrofobní chromatografií a ultrafiltrací.  $\beta$ -galaktosidasa byla optimálně aktivní při  $pH$  9 a teplotě 26°C. Aktivita enzymu byla vysoce citlivá do teploty 30°C a při teplotě nad 40°C již byla nedetekovatelná (Fernandes et al., 2002).

Enzym byl také hodnocen z hlediska hydrolýzy laktosy. Více než 50 % hydrolýzy laktosy bylo dosaženo během osmi hodin v prostředí pufru a aktivitě enzymu

1 U ml<sup>-1</sup>. V přítomnosti 0,1% (w/v) polyethyleniminu byla hydrolýza laktosy zvýšena na 70 %. Rozsah hydrolýzy laktosy v mléku byl 40-50 %.

Enzym byl také imobilizován na Sepharosu prostřednictvím aktivačních činidel s 60-70% zůstatkem aktivity enzymu. Imobilizovaný enzym byl více stabilní a jeho schopnost hydrolyzovat laktosu byla srovnatelná se schopností hydrolýzy laktosy volného enzymu (Fernandes et al., 2002).

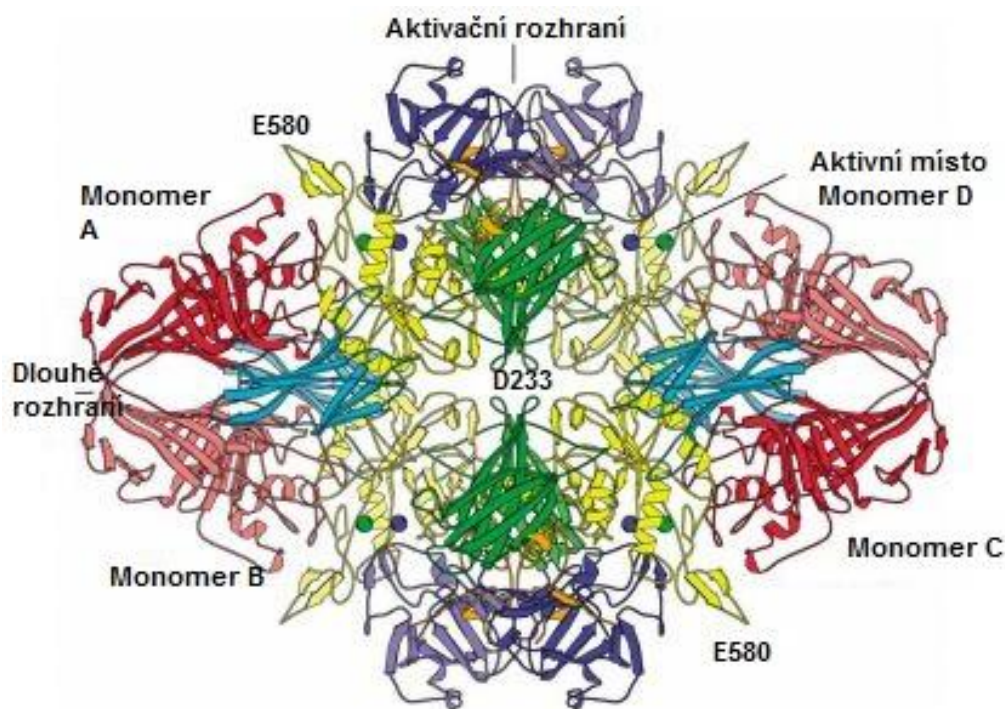
Naopak termostabilní  $\beta$ -galaktosidasa byla izolována z plísně *Aspergillus alliaceus*, která byla obsažena ve shnilém banánu. Jako optimální teplota a *pH* pro volný enzym byly zjištěny hodnoty 45°C a 7,2. Pro imobilizovaný enzym se teplotní optimum posunulo na hodnotu 50°C a *pH* optimum zůstalo stejné, jako v případě volného enzymu, tedy 7,2. Imobilizovaný enzym si zachoval 43 % aktivity volného enzymu. Studium operační stability enzymu ukázalo, že enzym si zachoval 90 % své počáteční aktivity poté, co byl použit čtyřikrát (Sen et al., 2012).

### 3.2.2. Struktura $\beta$ -galaktosidasy

$\beta$ -galaktidasa z *E. coli* je tetrametr, který zahrnuje čtyři polypeptidové řetězce, označované písmeny A-D. Každý tento řetězec se skládá z 1023 aminokyselin (Matthews, 2005).

Každý 1023-aminokyselinový monomer je tvořen pěti doménami, 1-5, které jsou znázorněny modrou, zelenou, žlutou, tyrkysovou a červenou barvou (viz obrázek 5).

Doména 3 obsahuje strukturu barelu, kde se nachází aktivní místo. To je konkrétně lokalizováno na C-konci barelu (Matthews, 2005). Obrázek 5 znázorňuje strukturu  $\beta$ -galaktosidasy.



**Obr. 5: Struktura  $\beta$ -galaktosidasy.** Oranžová = doplňující peptid, modrá = doména 1, zelená = doména 2, žlutá = doména 3, tyrkysová = doména 4, červená = doména 5. Světlejší a temnější stíny dané barvy jsou použity k rozlišení stejných domén v různých podjednotkách. Kovové kationty v každém ze čtyř aktivních míst jsou znázorněny jako kuličky:  $\text{Na}^+$  = zelená,  $\text{Mg}^{2+}$  = modrá (Upraveno podle: Matthews, 2005).

Čtyři monomery v tetrameru jsou uspořádány kolem tří vzájemně kolmých os symetrie. Tyto osy formují tři odlišná rozhraní mezi rozdílnými páry monomerů. První „dlouhé“ rozhraní je tvořeno horizontální osou, která uvádí do souvislosti monomer A s B a také monomer C s D. Druhé „aktivační“ rozhraní je tvořeno vertikální osou, která uvádí do souvislosti monomer A s D a B s C (Matthews, 2005).

### 3.2.3. Hydrolýza laktosy

Hydrolýza laktosy může probíhat buď v kyselém prostředí za zvýšené teploty ( $150^{\circ}\text{C}$ ) nebo enzymovou katalýzou za využití enzymu  $\beta$ -galaktosidasy. Ve srovnání s chemickou hydrolýzou enzymová hydrolýza laktosy dovoluje mírnější reakční podmínky, tedy nižší teplotu a vyšší  $pH$  (Grossová et al., 2008).

Mezi další výhody enzymové hydrolýzy laktosy patří také zamezení vzniku vedlejších produktů, které často vznikají při hydrolýze chemické. Dále nedochází k degradaci různých dalších sloučenin, které jsou obsaženy v mléčných výrobcích. Nevýhodou chemické hydrolýzy je častý vznik různých nepříjemných chutí, vůní či barev v mléčném výrobku (Mlichová & Rosenberg, 2006).

Při výrobě sýra vzniká syrovátka jako odpadní produkt, který způsobuje závažné ekonomické a environmentální problémy. Takto vzniklá syrovátka se následně vypouští do řek a způsobuje tak jejich vážné znečištění. Z tohoto důvodu se provádí hydrolýza laktosy, která je v syrovátce přítomna. Hydrolýzou laktosy se syrovátka přemění na sladký sirup, tvořený především glukosou a galaktosou, který může být použit jako sladidlo do mléčných výrobků, cukrářských výrobků, pekárenských výrobků a sladkých nápojů (Grossová et al., 2008).

### 3.3. Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy

Imobilizované enzymy se definují jako enzymy, které jsou omezené v pohybu nebo jsou umístěny ve vymezeném prostoru. Mají však zachovanou svoji aktivitu (Chibata, 1978).

V průmyslu jsou požadovány enzymy, které vykazují vysokou produktivitu a stabilitu a především možnost opakovaného použití. Imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy byla provedena ke zvýšení její stability a znuvupoužitelnosti (Verma et al., 2012).

Další nespornou výhodou imobilizovaných enzymů je jejich snadná separace z reakční směsi a žádné znečištění produktu enzymem, což je potřebné především v potravinářském průmyslu. Enzymy pocházejí především z různých druhů bakterií a kvasinek, které nejsou považovány za bezpečné.

Imobilizace enzymů má však i jisté nevýhody. Proces imobilizace je spjatý s poklesem enzymové aktivity, únikem nebo desorpcí enzymu z matrixu. Pokles aktivity po imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy se pohybuje od 0,01 % - 90 %, což záleží na metodě imobilizace a na zdroji enzymu. Tato nevýhoda však může být kompenzována možností opakovaného použití enzymu po jeho imobilizaci (Grossová et al., 2008).

### 3.3.1. Historie imobilizace enzymů

V roce 1916 Nelson a Griffin provedli imobilizaci invertasy (sacharasy) na pevný povrch aktivního uhlí a hydroxidu hlinitého (Nelson & Griffin, 1916).

V tomto období byly imobilizační techniky používány především k tvorbě adsorbentů pro izolaci proteinů adsorpcí na jednoduché organické nosiče, jako jsou například sklo, hliník nebo hydrofobní sklo potažené látkou.

V padesátých letech stále převažovala imobilizace prostřednictvím fyzikálních metod. Proteiny a enzymy byly imobilizovány fyzikální adsorpcí na pevné nosiče. Příkladem je imobilizace  $\alpha$ -amylasy na aktivovaný uhlík, bentonit nebo jí. Dalšími příklady imobilizace fyzikální adsorpcí je imobilizace AMP deaminasy na křemík nebo imobilizace chymotrypsinu na kaolinit (Buchholz et al., 2005).

Metoda jednoduché fyzikální adsorpce byla postupně zaměňována za specifickou iontovou adsorpci. Příkladem je imobilizace chymotrypsinu na fosfocelulosu, imobilizace DNAasy na celulosu nebo imobilizace lipasy a katalasy na styrenpolyaminostyren (Buchholz et al., 2005).

K prvnímu využití imobilizovaného enzymu v průmyslu došlo při výrobě kukuřičného sirupu, při výrobě opticky čistých aminokyselin a později také při výrobě penicilinu G (Buchholz et al., 2005).

V dalších letech se již stále více imobilizuje prostřednictvím kovalentních vazeb. Fueller et al. (1980) imobilizovali NADH za použití dvou ve vodě rozpustných polymerů. Imobilizovaný koenzym měl větší relativní aktivitu při  $pH$  9, než měl koenzym volný (Fueller et al., 1980). Objevuje se také metoda enkapsulace, kdy jsou enzymy zadrženy v semipermeabilních sférických membránách označovaných jako umělé buňky. Zdokonalují se metody zadržení enzymů. Používají se syntetické polymerní gely jako například PVA (polyvinylalkohol), PAAm (polyakrylamidový gel) nebo se používají přírodní polymery. Příkladem přírodních polymerů je nitrocelulosa nebo škrob.

Později se objevuje metoda zesíťování. Enzymy nejsou vázány na žádný nosič. Za použití bifunkčního cross-linkeru jakým je například glutaraldehyd jsou enzymy vzájemně zesíťovány prostřednictvím koncových skupin. V sedmdesátých letech dochází k imobilizaci enzymů mikrobiálního původu a s přístupem rekombinantních organismů došlo k velkému rozvoji používání enzymů v průmyslu (Buchholz et al., 2005).

V devadesátých letech dochází k neustálému zdokonalování metod imobilizace a stále větší pozornost je věnována vývoji enzymů, které jsou nejen vysoce aktivní, ale také stabilní v organických rozpouštědlech za vhodných podmínek.

Objevuje se také imobilizace na magnetické materiály jako je například Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> obalený chitosanem (Klibanov, 1997).

Goetz et al. (1991) vyvinuli všestranný magnetický nosič složený z částic křemíku, který může být použit pro absorpční chromatografii i pro enzymovou imobilizaci. Magnetické kuličky připravili elektrostatickým vkládáním střídajících se vrstev koloidního oxidu křemičitého a kationového polymeru na magnetické částice nikelnatého pláště. Tento magnetický materiál použili k imobilizaci invertasy. Enzym si zachoval stejnou aktivitu po dobu osmi dní. Po dvacetipěti dnech si enzym udržel 50 % své původní aktivity (Goetz et al., 1991).

### 3.3.2. Metody imobilizace

Imobilizované enzymy jsou stále více žádány v průmyslu a biotechnologiích díky jejich značným výhodám. V posledních několika letech se v literatuře vyskytují nové zajímavé objevy a patenty, které ukazují, že imobilizace enzymů vstoupila do nové fáze (Brady & Jordaan, 2009).

Dnes jsou imobilizovaná  $\beta$ -galaktosidasa a ostatní enzymy intenzivně používány ve velkém měřítku. Příklady využití imobilizovaných enzymů jsou znázorněny v tabulce 4.

**Tab. 4: Průmyslové aplikace imobilizovaných enzymů** (Upraveno podle: Grossová et al., 2008).

<i>Substrát</i>	<i>Produkt</i>	<i>Imobilizovaný enzym</i>
Glukosa	Fruktosa	glukosa isomerasa
<b>Laktosa</b>	<b>Glukosa, Galaktosa</b>	<b><math>\beta</math>-galaktosidasa</b>
Sacharosa	Glukosa, Fruktosa	invertasa
D,L-metionin	L-metionin	aminoacylasa
3-kyanopyridin	Nikotinamid	nitril hydratasa
Kys. fumarová	L-jablečná kyselina	fumarasa
Progesteron	17- $\alpha$ -hydroxy-progesteron	17-hydroxylasa

Ačkoliv mnoho studií popisuje efektivní imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy izolované z rekombinantní *Escherichia coli*, její aplikace v potravinářském průmyslu je komplikovaná, protože tento mikroorganismus není všeobecně uznáván jako bezpečný. V současnosti nejsou za bezpečné zdroje  $\beta$ -galaktosidasy považovány dále

*Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis*, a *Kluyveromyces fragilit* (Z. Grossová et al., 2008).

$\beta$ -galaktosidasa byla imobilizovaná několika metodami na různé druhy matric. Mezi tyto metody patří například kovalentní navázání, zadržení, adsorpce, zesíťování, zapouzdření, vlastní samostatná imobilizace a kombinace těchto metod.

Výběr vhodné metody imobilizace záleží především na vlastnostech enzymu.  $\beta$ -galaktosidasy z různých zdrojů mají různé vlastnosti, jako je molekulová hmotnost, délka proteinového řetězce a pozice aktivního místa (Bravy & Jordaan, 2009).

Imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy může dramaticky ovlivnit vlastnosti enzymu.

### 3.3.2.1. Adsorpce

Fyzikální adsorpce je nejjednodušší a nejstarší metoda imobilizace enzymů na nosiče. Imobilizace adsorpcí je založena na fyzikálních interakcích mezi biokatalyzátorem a nosičem. Tyto interakce jsou například vodíkové vazby, hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly a jejich různé kombinace (Grossová et al., 2008).

Navzdory jednoduchosti je použití této metody limitováno tendencí enzymu desorbovat z nosiče a také velikou citlivostí enzymu k okolním podmínkám jako je teplota a iontová síla (Grossová et al., 2008).

Husain et al. (2011) imobilizovali  $\beta$ -galaktosidasu z *Aspergillus oryzae* na nanočástice oxidu zinečnatého prostřednictvím jednoduché fyzikální adsorpce. Nanočástice oxidu zinečnatého vykázaly 85% výtěžek imobilizace. Imobilizovaný i volný enzym vykazovaly stejné *pH* optimum 4,5 a teplotní optimum při teplotě 50°C. Dále zjistili, že po 9 hodinách inkubace  $\beta$ -galaktosidasy imobilizované na nanočástice oxidu zinečnatého došlo k hydrolyze 81 % laktosy přítomné v syrovátce (Husain et al., 2011).

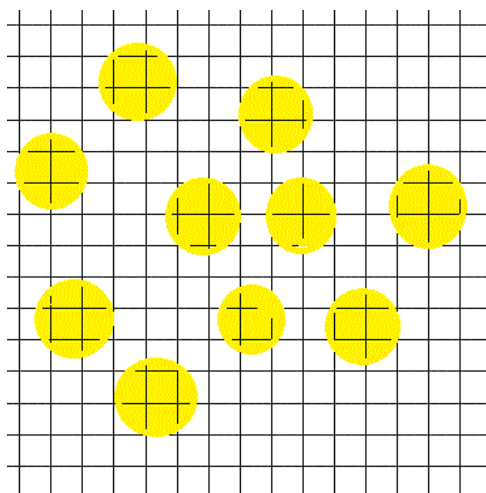
### 3.3.2.2. Zadržení

Metoda zadržení je založena na lokalizaci enzymu v mřížce polymerního matrixu nebo membrány. Tato metoda byla vyvinuta a široce rozšířena především pro imobilizaci buněk (Grossová et al., 2008).

Zadržení chrání enzymy tím, že zamezuje přímému kontaktu biokatalyzátorů s okolním prostředím (Bravy & Jordaan, 2009).

Hlavní omezení aplikace této metody pro imobilizaci enzymů je možný únik enzymu během opakovaného používání vzhledem k malé molekulové hmotnosti enzymu oproti molekulové hmotnosti buňky. Tato metoda se dělí do několika typů, mezi které patří například použití mřížky, použití mikrokapslí nebo membrány. Pro imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy je nejvíce rozšířené použití mřížky. Enzym je zadržen v matrixu různých typů syntetických nebo přírodních polymerů (Grossová et al., 2008).

Nichele et al. (2011) imobilizovali  $\beta$ -galaktosidasu zadržením v trojrozměrné křemičité síti. Aktivita imobilizovaného enzymu byla hodnocena *in vitro* za použití oNPG při teplotě 37°C a *pH* 7,4 (simulace podmínek v lidském střevě). Došli k závěru, že imobilizovaný enzym je za těchto podmínek více stabilní a více aktivní, než volný enzym. Takto imobilizovaný enzym je chráněn od vnějších podmínek, což umožňuje zachování jeho funkce i v extrémních podmínkách *pH* a teploty (Nichele et al., 2011). Na obrázku 6 je znázorněna imobilizace enzymu zadržením v síťce polymeru.



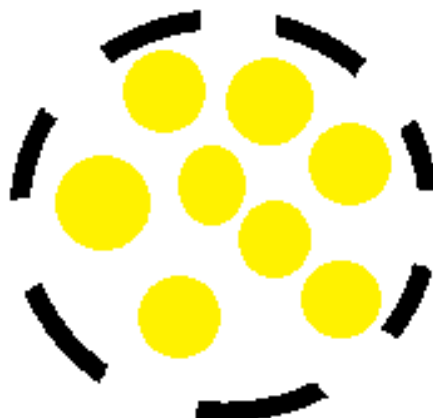
**Obr. 6: Zadržení enzymů v síťce polymeru.** Enzym je reprezentován kruhy (Upraveno podle: Bravy & Jordaan, 2009).



### 3.3.2.3. Enkapsulace

Zapouzdření je imobilizační metoda velice podobná metodě zadržení. Zapouzdření také chrání enzymy před vlivem vnějšího prostředí, ale aplikace této metody pro imobilizaci enzymů s mohutnými substráty je limitována, protože jsou náchylné k omezenému přenosu hmoty (Bravy & Jordaan, 2009).

Wu et al. (2010) imobilizovali  $\beta$ -galaktosidasu enkapsulací za použití tetraethylortokřemičitanu jako zdroje křemíku a triblokového kopolymeru P123 jako templátu. Imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy enkapsulací provedli ve třech různých modelech, a to bez ochrany enzymu, s ochranou enzymu chránícím činidlem a ošetřením enzymu technikou molekulárního otisku. Nejvyšší enzymové aktivity  $\beta$ -galaktosidasy bylo dosaženo technikou molekulárního otisku. Hydrolytická aktivita enzymu ošetřeného technikou molekulárního otisku byla až třikrát vyšší ve srovnání s enzymem bez ochrany. Enzym ošetřený chránícím činidlem vykazoval hydrolytickou aktivitu 1,3 krát vyšší, než jakou aktivitu vykazoval enzym bez ochrany. Pro měření hydrolytické aktivity  $\beta$ -galaktosidasy byly použity substráty laktosa a *orto*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (oNPG). Ochranný účinek techniky molekulárního otisku na aktivitu enzymu po jeho enkapsulaci byl lepší, než je tomu v případě ošetření enzymu chránícím činidlem (Wu et al., 2010). Na obrázku 7 je znázorněna imobilizace enzymu enkapsulací.



**Obr. 7: Enkapsulace enzymů.** Enzym je reprezentován kruhy (Upraveno podle: Bravy & Jordaan, 2009).

### 3.3.2.4. Zesíťování

Metoda zesíťování využívá bifunkční nebo multifunkční sloučeniny, které slouží jako reagenty pro intermolekulární křížové propojení biokatalyzátorů.

V případě imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy je zesíťování často používáno v kombinaci s ostatními imobilizačními metodami, především s adsorpcí a zadržením (Grossová et al., 2008).

Guidini et al. (2010) imobilizovali  $\beta$ -galaktosidasu za použití glutaraldehydu jako zesíťovacího činidla. Maximální aktivita enzymu byla zjištěna po použití glutaraldehydu o koncentraci  $3,38 \text{ g l}^{-1}$ . Glutaraldehyd nechali působit po dobu 1,87 hodiny, po této době byla zjištěna nejvyšší aktivita enzymu. Zbytková aktivita imobilizovaného enzymu bez použití glutaraldehydu jako zesíťovacího činidla byla určena na 51 % z počáteční aktivity po třiceti opakovaných použitích enzymu. Zatímco imobilizovaný enzym, který byl po adsorpci zesíťovaný pomocí glutaraldehydu, vykazoval 90 % své počáteční aktivity (Guidini et al., 2010).

### 3.3.2.5. Kovalentní navázání

Tato metoda je nejčastěji používána pro imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy. Enzymy jsou kovalentně navázány na nosič prostřednictvím funkčních skupin v enzymu, které nejsou esenciální pro katalytickou aktivitu.

Velkou výhodou této imobilizace je fakt, že enzym nemůže uniknout z nosiče. Další výhodou je jednodušší interakce se substrátem.

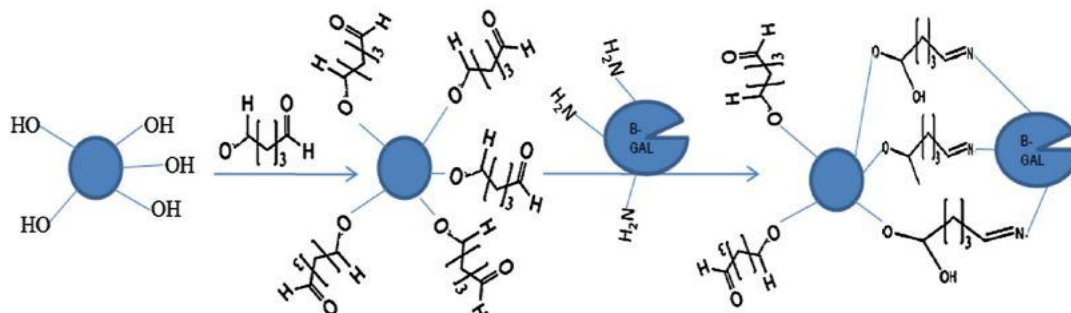
Na druhou stranu má tato metoda i určité nevýhody. Jednou z nich je vysoká cena této metody a nízký výnos aktivity enzymu vzhledem k vystavení biokatalyzátoru toxickým reagentům a náročným reakčním podmínkám (Grossová et al., 2008).

Pro imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy prostřednictvím kovalentního navázání enzymu bylo použito několik nosičů. Byly použity různé oxidy jako například oxid hlinitý nebo oxid křemičitý (Grossová et al., 2008).

Na obrázku číslo 8 je schematicky znázorněna imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy na nanočástice oxidu křemičitého aktivované glutaraldehydem.

El-Aassar et al. (2013) imobilizovali  $\beta$ -galaktosidasu na polymerní nosič polyethylenimin (PEI).  $\beta$ -galaktosidasa byla kovalentně imobilizována na polymerní nosič za použití glutaraldehydu jako imobilizačního činidla. Byly studovány vlastnosti imobilizovaného enzymu. Teplotní optimum imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy bylo o  $5^\circ\text{C}$

vyšší, než teplotní optimum volného enzymu. Imobilizovaná  $\beta$ -galaktosidasa vykazovala mnohem vyšší tepelnou stabilitu, než volný enzym (El-Aassar et al., 2013).



**Obr. 8: Kovalentní navázání enzymu  $\beta$ -galaktosidasy na částice oxidu křemičitého, které byly aktivovány glutaraldehydem (Převzato z: M. L. Verma et al., 2012).**

Torres & Batista-Viera (2012) imobilizovali  $\beta$ -galaktosidasu z *Bacillus circulans* na akrylové nosiče aktivované epoxidem, a to na Eupergit C a Sepabeads EP. U obou derivátů bylo dosaženo po 2 hodinách a při 50°C stupně hydrolyzy laktosy v syrovátce mezi 80-90 %. Deriváty také mohly být použity až v sedmi cyklech hydrolyzy laktosy (Torres & Batista-Viera, 2012).

Vasileva et al. (2012) použili k imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy modifikované polypropylenové membrány. Nejvyšší relativní aktivita imobilizovaného enzymu byla zjištěna u membrány modifikované s 10% hexamethyldiaminem, a to 93 %. Enzym byl imobilizován pomocí glutaraldehydu (Vasileva et al., 2012).

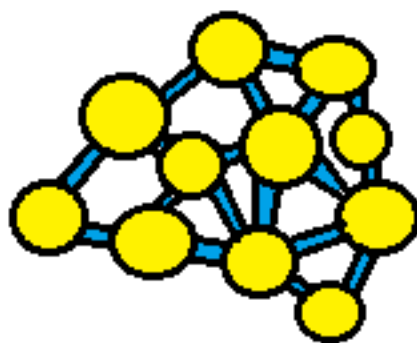
### 3.3.2.6. Samostatná imobilizace – spherezymy

Imobilizace bez použití nosiče je možná použitím činidla, které spojí enzymy jeden k druhému bez uchycování se k podpoře. Takovým činidlem je například glutaraldehyd.

Fyzikálně silnější biokatalyzátory mohou být produkovány propojením, kde jsou enzymy ve velké blízkosti, jako jsou například proteinové krystaly. Velikost částic se pohybuje od 1 do 100  $\mu\text{m}$  a má vysokou mechanickou stabilitu a mohou fungovat v organických rozpouštědlech.

Pokud krystal obsahuje pouze jeden enzym, tak tato metoda nezajišťuje žádné znečištění. Na druhou stranu tato metoda vyžaduje složitou purifikaci proteinu. Ačkoli je tato metoda široce aplikovatelná, funguje pouze pro krystalizovatelné enzymy (Bravy & Jordaan, 2009).

Na obrázku 9 je znázorněna samostatná imobilizace enzymu. Jordaan et al. (2009) imobilizovali lakasu použitím metody spherezymu za získání až 53,9 % původní aktivity enzymu. Imobilizovaný enzym vykazoval vyšší tepelnou stabilitu a také vyšší stabilitu při nízkých hodnotách *pH* (Jordaan et al., 2009).



**Obr. 9: Vlastní samostatná imobilizace enzymů.** Enzym je reprezentován kruhy (Upraveno podle: Bravy & Jordaan, 2009).

### 3.4. Metody stanovení laktosy

Mezi nejčastější metody stanovení sacharidů patří především titrační metody. Dále se používají metody biochemické a metody instrumentální. České normy pro stanovení laktosy a produktů její degradace jsou znázorněny v tabulce 5.

**Tab. 5: Normy pro stanovení laktosy** (Upraveno podle: Legarová, 2011).

<b>Normy</b>	<b>Název normy</b>
ČSN 46 7092-23	Metody zkoušení krmiv – Část 23: Stanovení obsahu laktosy
ČSN 57 0105-6-1	Metody zkoušení mléčných výrobků sušených a zahuštěných. Polarimetrické stanovení sacharosy a laktosy.
ČSN 57 0111-6	Metody zkoušení kaseinu. Stanovení obsahu laktosy.
ČSN ISO 5765-1	Sušené mléko, sušené zmrzlinové směsi a tavené sýry – Stanovení obsahu laktosy.
ČSN ISO 5765-2	Sušené mléko, sušené zmrzlinové směsi a tavené sýry – Stanovení obsahu laktosy.
ČSN 57 0530	Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků.
ČSN 57 0107	Metody zkoušení sýrů, tvarohů, krémů a pomazánek.
ČSN 57 0536	Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem.
ČSN ISO 22662	Mléko a mléčné výrobky – Stanovení obsahu laktosy vysokoučinnou kapalinovou chromatografií.

### 3.4.1. Titrační metody

Mezi titrační metody stanovení laktosy patří metoda dle Luff-Schoorla. V prvním kroku se ze vzorku odstraní bílkoviny a tuk vysrážením Carezovými činidly. Carezovo činidlo 1 je heptahydrát síranu zinečnatého a Carezovo činidlo 2 je hexakvanoželeznatan draselný. Následně se k filtrátu přidá Luffův roztok, což je roztok měďnaté soli. Tato měďnatá sůl je poté redukována laktosou na oranžový oxid měďný. Nezreagovaná měďnatá sůl se poté stanoví jodometricky. Z výsledku se poté vypočítá obsah zreagované laktosy (Doležálek et al., 1980).

Podle Legarové a Kouřimské (2011) však tato metoda není pro stanovení laktosy ve fermentované syrovátce příliš vhodná, protože je kromě laktosy touto metodou stanovován i obsah fermentací vzniklých monosacharidů (Legarová & Kouřimská, 2011).

### 3.4.2. Biochemické metody

Biochemické metody stanovení obsahu laktosy využívají působení enzymů. Proto se také nazývají metody enzymové. Využívá se především působení enzymu  $\beta$ -galaktosidasy, který hydrolyzuje laktosu na glukosu a galaktosu. Dále se využívá enzym hexokinasa, která za účasti ATP fosforyluje glukosu na glukosu-6-fosfát. Dále se také využívá enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, která převádí glukosu-6-fosfát za přítomnosti NADP na 6-fosfoglukonát. NADP při této oxidoredukční reakci přechází na svoji redukovanou formu NADPH. Obsah NADPH se poté stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm (Cvak et al., 1992; Legarová 2011).

### 3.4.3. Instrumentální metody

Mezi instrumentální metody, kterými je možné stanovit laktosu, patří například metody infračervené spektroskopie v blízké či střední oblasti spektra. Laktosa se také může stanovit metodou kapilární zónové elektroforézy. Dále jsou to metody chromatografické. Laktosa se stanoví plynovou chromatografií (GC) nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

#### 3.4.3.1. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie se používá v kvalitativní i kvantitativní analýze. Nejdůležitější je použití ve strukturní analýze a identifikaci organických i anorganických sloučenin. Knihovna spekter je v paměti počítače, jehož program s ní porovnává spektrum vzorku. Při kvantitativní analýze lze použít Lambert-Beerova zákona (Klouda, 2003a).

Významnou měrou se infračervená spektra využívají pro kvantitativní analýzu, a to i složitých vzorků v řadě odvětví jako je například petrochemie, farmaceutický, papírenský či potravinářský průmysl. V mnoha případech je možné stanovit více složek vedle sebe, aniž je nutné dělit složité směsi, a to přímo ve výrobním procesu. Infračervená spektrometrie se proto zařazuje mezi tzv. procesní analytické metody, kdy se klade důraz na rychlost samotné analýzy včetně možnosti kontinuální on-line analýzy ve výrobním procesu (na výrobní lince) nikoli na její přesnost. Takto lze

například zároveň stanovit obsah tuků, bílkovin, laktosy a močoviny v mléce a mléčných výrobcích či obsah ethanolu a sacharidů v alkoholických nápojích (například během probíhajících kvasných procesů), ([www.vscht.cz](http://www.vscht.cz)).

### 3.4.3.2. Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza je separační metoda založená na migraci složek vzorku ve stejnosměrném elektrickém poli. Jedná se o nejpoužitelnější metodu v oblastech potravinářství, životního prostředí, materiálůvých oborů, biotechnologického a mikrobiologického odvětví, medicíny a farmacie. Tato metoda využívá zákonitosti o přitahování nabitých částic v kapiláře. Postačují zde mikrolitrové objemy vzorků. Částice jsou dle vlastností separovány do úzkých zón. Základem je vytvořit prostředí, kde jsou látky ionizovány a po vložení stejnosměrného elektrického napětí začnou migrovat kapilárou a rozdělovat se do jednotlivých zón, jež jsou na konci kapiláry detekovány. Touto metodou je možné stanovit minerální ionty, organické kyseliny, barviva a sacharidy, včetně laktosy ([www.chempoint.cz](http://www.chempoint.cz)).

### 3.4.3.3. Plynová chromatografie

Při plynové chromatografii se vzorek dávkuje do proudu plynu, který jej unáší dále kolonou. V koloně se složky zachycují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu jsou poté detekovány na detektoru (Klouda, 2003b).

Použitím plynové chromatografie s reverzní fází Newel et al. (2001) studovali povrchovou energii krystalické, amorfni a mleté laktosy. Cílem bylo posouzení rozdílů povrchových energií, vzhledem k poruchám, které způsobují. Zjistili, že není podstatný rozdíl mezi povrchovou energií krystalické a amorfni laktosy. Povrchová energie mleté laktosy byla velice podobná povrchové energii amorfni laktosy. Mletý materiál tedy bude interagovat na fázovém rozhraní podobně jako materiál amorfni (Newell et al., 2001).

#### 3.4.3.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Metoda HPLC je stejně jako metoda GC založena na separaci látek mezi mobilní a stacionární fází. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. U kapalinové chromatografie se může pracovat i za laboratorní teploty, protože není potřeba převádět vzorek na plyn. Jako detektory v kapalinové chromatografii se nejčastěji používají refraktometrický detektor, fotometrický detektor, fluorescenční detektor a elektrochemický detektor (Klouda, 2003c).

Euber & Bruner (1979) popisují stanovení laktosy v mléčných výrobcích použitím metody HPLC. Vzorky byly deproteinovány 6% kyselinou trichloroctovou. Laktosa byla separována nastříknutím vzorku do karbohydrátové kolony Bondapak. Byla použita isokratická eluce s mobilní fází acetonitril/voda. Detekce byla refraktometrická (Euber & Bruner, 1979).

Dalším příkladem stanovení laktosy metodou HPLC je práce Bronse a Oliemana (1983), kteří separovali pomocí metody HPLC redukující cukry a stanovovali laktosu v mléce. Při různých teplotách kolony sledovali úbytek redukujících cukrů, které tvořily Schiffovy báze s aminoskupinami na koloně. V závislosti na teplotě, typu a stáří kolony dosahovaly tyto ztráty hodnot 0-100 %. Za použití acetonitrilu jako mobilní fáze tato metoda vedla k variačnímu koeficientu menšímu než 1 % pro stanovení laktosy v odtučněném mléce (Brons & Olieman, 1983).

#### 3.4.3.5. Biosensor

Aplikace imobilizovaných enzymů vytvořila v devadesátých letech nový proces pro stanovování analytů. Imobilizované enzymy spojené s elektrochemickými převodníky vytváří přístroje nazvané biosensory, které dokáží stanovovat analyty rychle, opakovaně a levně i ve složitých směsích (Adányi et al., 1999).

Volesky a Emond (1979) konstruovali specifický systém na potenciometrické stanovení laktosy. Glukosaoxidasu a  $\beta$ -galaktosidasu imobilizované na fenol-formaldehydové pryskyřici byly použity v analytické koloně. Doba měření byla přibližně 15 minut (Volesky & Emond, 1979).

Adányi et al. (1999) imobilizovali do biosensoru tři typy biorekogniční vrstvy. První obsahovala enzymy  $\beta$ -galaktosidasu a galaktosaoxidasu. Druhá vrstva obsahovala  $\beta$ -galaktosidasu a glukosaoxidasu. Třetí vrstva obsahovala všechny tyto tři



enzymy dohromady. Laktosa byla rozložena a oxidována imobilizovanými enzymy za vzniku peroxidu vodíku. Tento peroxid vodíku byl poté amperometricky detekován. Analyzovány byly také vzorky komerčně vyráběného mléka. Vrstva obsahující  $\beta$ -galaktosidasu a glukosaoxidasu a vrstva obsahující všechny tři enzymy se ukázaly být nejvíce vhodné pro stanovení laktosy v mléce pomocí tohoto biosensoru (Adányi et al., 1999).

### 3.5. Metody stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy

Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy se nejčastěji stanovuje spektrofotometricky. Je možné však stanovit aktivitu také chemiluminiscenčně nebo za použití kapalinové chromatografie.

Spektrofotometricky se aktivita  $\beta$ -galaktosidasy měří za použití umělých nebo přirozených substrátů. Umělým substrátem je například *o*NPG, X-gal nebo laktulosa. Přirozeným substrátem je laktosa (Juers et al., 2000).

Principem umělého substrátu je tvorba barevné sloučeniny jako produktu enzymové reakce.  $\beta$ -galaktosidasa katalyzuje rozklad bezbarvého *o*-NPG na žlutý *ortho*-nitrofenol, který vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 405 nm.

Při použití laktosy jako přirozeného substrátu se stanovuje úbytek laktosy a přírůstek glukosy a galaktosy jako produktů enzymové reakce. Tyto změny je možné studovat například metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Porovnává se výška a plocha vzniklých píků s výškou a plochou píků standardů pro laktosu, glukosu a galaktosu. Při použití metody kapalinové chromatografie se jako substráty používají laktosa nebo  $\epsilon$ -N-1-(1-deoxylaktulosyl)-L-lysin (Horner et al., 2011).

Další metodou stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy je chemiluminiscence. Při této metodě se používá komerční přípravek Lumi-Gal 350. Tento přípravek obsahuje fenygalaktosa substituovaný dioxethan jako substrát. Během enzymové reakce vzniká ze substrátu velmi nestabilní dioxethan, který vykazuje chemiluminiscenci. Metoda chemiluminiscence je metoda levná, jednoduchá a až dvacetkrát citlivější, než je metoda spektrofotometrická (Baele et al., 1992).

## 4. Experimentální část

### 4.1. Materiály

Hydrogenfosforečnan draselný	Merck, Německo
Dihydrogenfosforečnan draselný	Merck, Německo
EDC-HCl	Fluka, Švýcarsko
NHS 98%	Sigma Aldrich, USA
Glutaraldehyd 50%	Fluka, Švýcarsko
Jodistan sodný	Sigma Aldrich, USA
Chlorid hořečnatý hexahydrát	Lachema, Česká republika
Hydroxid draselný	Lach-Ner, Česká republika
Kyselina fosforečná	Chemapol, Česká republika
Kyselina trifluoroctová	Sigma Aldrich, USA
Hydroxid sodný	Lachema, Česká republika
Síran zinečnatý heptahydrát	Sigma Aldrich, USA
Hexakvanoželeznatan draselný trihydrát	Sigma Aldrich, USA
Laktozym	Sigma Aldrich, USA
$\alpha$ -NPG	Sigma, Švýcarsko
Magnetické nanočástice $\text{Fe}_3\text{O}_4$ obalené chitosanem	Nanocentrum, Česká republika
Magnetické mikročástice Perlosa MG 100	Iontosorb, Česká republika
Laktosa	Sigma Aldrich, USA
D-glukosa	Sigma Aldrich, USA
D-galaktosa	Sigma Aldrich, USA

## 4.2. Přístroje

Analytické váhy	Sartorius, Německo
Elektromagnetická míchačka	IKA, Německo
Pipety (2 µl – 5 ml)	Eppendorf, Německo
	Biohit, Finsko
Spektrofotometr Biochrom (WPA)	Biochrom Ltd., Velká Británie
Digitální předvážky	Kern, Německo
pH-metr inoLab Level 1	WTW, Německo
Vortex MS-1	IKA, Německo
Centrifuga 5415R	Eppendorf, Německo

### Chromatografický systém:

HPLC	Knauer Smartline Praha, Německo
Chromatografická kolona – Zorbax NH <sub>2</sub>	Waters, USA
Detektor ELSD 3300	Alltech, USA
Termostat kolony CROCO-CIL	Ercatech AG, Švýcarsko
PC s vyhodnocovacím programem Clarity	DATA APEX, Česká republika

## 4.3. Metody

### 4.3.1. Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy na mikročástice Perlosa MG 100

Do mikrozkušky bylo naváženo 50 mg mikročástic Perlosa MG 100 modifikovaných celulosou. Byly přidány 2 ml roztoku jodistanu sodného o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ . Poté byla směs třepána na magnetickém rotátoru po dobu 22 hodin při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$ . Po uplynuté době byly mikročástice odděleny od supernatantu magnetickým separátorem a supernatant byl odpipetován do odpadu. Takto byly mikročástice promyty desetkrát pufrům (K-Pi,  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ,  $\text{pH } 7$ ). Poté bylo přidáno 1,4 ml roztoku enzymu zředěného v poměru 1:100 pufrům (K-Pi,  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ,  $\text{pH } 7$ ). Enzym se imobilizoval na rotátoru po dobu 22 hodin při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$ . Po této době byl imobilizovaný enzym promyt desetkrát stejným pufrům za použití magnetického separátoru.

### 4.3.2. Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy na nanočástice $\text{Fe}_3\text{O}_4$ obalené chitosanem

Do mikrozkušky bylo naváženo 50 mg nanočástic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obalených chitosanem. Bylo přidáno 700  $\mu\text{l}$  roztoku *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDC-HCl) o koncentraci  $26 \text{ mmol l}^{-1}$  a 700  $\mu\text{l}$  roztoku *N*-hydroxysukcinimidu (NHS) o koncentraci  $52 \text{ mmol l}^{-1}$ . Ke směsi bylo přidáno 1,4 ml roztoku enzymu zředěného v poměru 1:100 pufrům (K-Pi,  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ,  $\text{pH } 7$ ). Směs byla třepána na magnetickém rotátoru 22 hodin při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$ . Po uplynuté době byl imobilizovaný enzym oddělen od supernatantu magnetickým separátorem a supernatant byl odpipetován do odpadu. Takto byl imobilizovaný enzym promyt celkem desetkrát stejným pufrům.

### 4.3.3. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy

Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla stanovena spektrofotometricky za použití umělého substrátu *ortho*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galaktopyranosidu (oNPG).  $\beta$ -galaktosidasa štěpí hydrolyticky umělý substrát za vzniku *ortho*-nitrofenolu, který má žlutou barvu. Intenzita tohoto žlutého zbarvení se měří spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm. K měření aktivity  $\beta$ -galaktosidasy byla použita skleněná kyveta. Do kyvety bylo napipetováno 1690  $\mu$ l 0,1 mol l<sup>-1</sup> K-Pi pufru *pH* 7 s koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů 4 mmol l<sup>-1</sup> a 10  $\mu$ l roztoku  $\beta$ -galaktosidasy zředěné puforem v poměru 1:100. Reakce byla odstartována přidáním 300  $\mu$ l 10 mmol l<sup>-1</sup> oNPG. Změna absorbance byla zaznamenána vždy po jedné minutě. Po dobu čtyř minut byla měřena celková změna absorbance  $\Delta A$ . Aktivita enzymu byla vypočítána podle vztahu :

$$\frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V}{\epsilon l},$$
 kde  $\frac{\Delta n}{\Delta t}$  je aktivita [kat],  $\Delta A$  je změna absorbance,  $\Delta t$  je časový interval [s],  $V$  je celkový objem reakční směsi v kyvetě [l],  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient [l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>] a  $l$  je šířka kyvety [cm].

V případě stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy imobilizované na magnetických mikročasticích a nanočasticích bylo postupováno následovně. Na dno kyvety bylo umístěno 50 mg magnetických mikročastic nebo nanočastic s imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou v 1690  $\mu$ l 0,1 mol l<sup>-1</sup> K-Pi pufru s koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů 4 mmol l<sup>-1</sup>. Reakce byla startována přidáním 300  $\mu$ l 10 mmol l<sup>-1</sup> substrátu. Po jedné minutě byla zaznamenávána změna absorbance a směs byla vždy půl minuty míchána a půl minuty usazována magnetickým separátorem. Takto bylo postupováno po dobu čtyř minut. Po této době byla zaznamenána výsledná změna absorbance  $\Delta A$ . Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla vypočtena podle vzorce uvedeného výše.

### 4.3.4. Stanovení vazebné kapacity $\beta$ -galaktosidasy

Vazebná kapacita imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy byla stanovena metodou Bradfordové. Nejdříve bylo změřeno množství proteinů ve vzorku enzymu, který byl použit k imobilizaci. Do kyvety byl napipetován 1 ml roztoku  $\beta$ -galaktosidasy stokrát zředěné K-Pi puforem (0,1 mol l<sup>-1</sup>, *pH* 7). Dále byly přidány 2 ml činidla Bradfordové (100 mg barviva Coomassie Brilliant Blue G 250 (0,01%, w/v), 50 ml etanolu (95%), 100 ml kyseliny fosforečné (85%), 850 ml destilované vody). Roztok byl promíchán na

vortexu. Po pěti minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Stejným způsobem bylo změřeno množství proteinů v supernatantu nad usazenými magnetickými nanočásticemi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a mikročásticemi Perlosa MG 100. Částice byly promyty pětkrát stejným pufrům. Po každém promytí byly v supernatantu stanoveny proteiny. Po třetím, čtvrtém a pátém promytí již supernatant neobsahoval žádné proteiny. Byla vypočítána vazebná kapacita β-galaktosidasy imobilizované na magnetické nanočástice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> obalené chitosanem a na magnetické celulosové mikročástice Perlosa MG 100.

#### 4.3.5. Hydrolýza laktosy v syrovátce β-galaktosidasou

Ke vzorku syrovátky byly přidány hořečnaté ionty tak, aby výsledná koncentrace byla 4 mmol l<sup>-1</sup>. Poté byl vzorek hydrolyzován. Hydrolýza byla provedena nejdříve volnou β-galaktosidasou. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 2,5 ml syrovátky a 0,5 ml roztoku enzymu zředěného K-Pi pufrům v poměru 1:1. Mikrozkušavka byla umístěna na automatický rotátor a reakce probíhala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo z reakční směsi odebráno 0,5 ml do nové mikrozkušavky. Bylo přidáno 5 μl kyseliny trifluoroctové (TFO, 10x zředěná) a 6,5 μl 1 mol l<sup>-1</sup> NaOH. Stejným způsobem byl připraven také vzorek považené syrovátky. Syrovátka byla vařena po dobu 10 minut. Poté byla ochlazená na laboratorní teplotu. Lipidy a proteiny ze syrovátky byly vysráženy Carrezovými činidly 1 a 2. Carrezovo činidlo 1 je hexakynoželeznatan draselný (3,6 mmol l<sup>-1</sup>) a Carrezovo činidlo 2 je síran zinečnatý (10 mmol l<sup>-1</sup>). Vzorek zhydrolyzované syrovátky byl naředěn 10 ml vody a poté bylo po kapkách pipetováno 1 ml Carrezova činidla 1 a 1 ml Carrezova činidla 2. Lipidy a proteiny sedimentovaly po dobu 10 minut. Poté byly odebrány 2 ml vzorku, který byl napipetován do centrifugační zkumavky. Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při teplotě 5°C a 12000 g. Po centrifugaci byl vzorek napipetován do nové centrifugační zkumavky s mikrospinem. Vzorek byl znovu centrifugován za stejných podmínek. Takto purifikovaný vzorek byl napipetován do HPLC vialky.

#### 4.3.6. Operační stabilita imobilizované $\beta$ -galaktosidasy

Operační stabilita imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy byla vyzkoušena celkem v osmi cyklech. K imobilizované  $\beta$ -galaktosidase v mikrozkuhavce bylo vždy přidáno 5 ml syrovátky s obsahem hořečnatých iontů o koncentraci  $4 \text{ mmol l}^{-1}$ . Směs byla míchána na automatickém rotátoru po dobu půl hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl imobilizovaný enzym oddělen od syrovátky pomocí magnetického separátoru a byl promyt třikrát K-Pi pufrém  $pH 7$ . K promytému imobilizovanému enzymu byl přidán nový alikvot 5 ml syrovátky a směs byla hydrolyzována opět půl hodiny při laboratorní teplotě na automatickém rotátoru. Tento cyklus byl opakován celkem osmkrát jak s nanočásticemi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , tak s mikročásticemi Perlosa MG 100.

Z hydrolyzované syrovátky bylo odebráno 0,5 ml do mikrozkuhavky a bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  TFO (10x zředěná) a 6,5  $\mu\text{l}$  NaOH ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ). Poté byl vzorek zředěn 10 ml vody a bylo přidáno 1 ml Carrezova činidla 1 a 1 ml Carrezova činidla 2, aby došlo k vysrážení lipidů a proteinů ze syrovátky. Srážení probíhalo po dobu 10 minut. Nakonec byly 2 ml roztoku napipetovány do nové mikrozkuhavky a vzorek byl centrifugován při teplotě  $5^\circ\text{C}$ , 5 minut a 12000 g. Poté byl vzorek centrifugován přes mikrospin za stejných podmínek. Takto purifikovaný vzorek byl napipetován do HPLC vialky.

#### 4.3.7. HPLC analýza vzorků syrovátky

Při HPLC analýze vzorků syrovátky byla použita isokratická eluce. Jako mobilní fáze byl použit 65% acetonitril. Byla použita chromatografická kolona Zorbax  $\text{NH}_2$ . Detekce byla elektrochemická za použití ELSD detektoru. Teplota v detektoru byla nastavena na  $55^\circ\text{C}$  a teplota termostatu pro kolonu byla nastavena na  $40^\circ\text{C}$ . Průtok byl nastaven na  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

#### 4.3.8. SDS-PAGE elektroforéza $\beta$ -galaktosidasy

Do dvou kádinek byl připraven dělicí a zaostřovací gel. Podle návodu bylo do dělicího gelu napipetováno 100  $\mu$ l SDS (10% w/v); 2,6 ml 1,5 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl *pH* 8,8; 4 ml akrylamidu/bisakrylamidu (30%/0,8% w/v); 3,2 ml destilované vody; 10  $\mu$ l tetraethylmethyldiaminu (TEMED, 99%). Nakonec bylo přidáno 100  $\mu$ l persulfátu amonného (APS, 10% w/v), který startuje polymeraci. APS byl připraven čerstvý navážením 50  $\mu$ g APS a jeho rozpuštěním v 0,5 ml destilované vody. Zaostřovací gel byl vytvořen napipetováním 2,9 ml destilované vody; 1,25 ml 0,5 mol l<sup>-1</sup> Tris HCl *pH* 6,8; 0,67 ml akrylamidu/bisakrylamidu (30%/0,8% w/v); 50  $\mu$ l SDS (10% w/v); 5  $\mu$ l TEMED (99%) a 50  $\mu$ l APS (10% w/v). Pasteurovou pipetou byl nalit dělicí gel mezi skla elektroforetické komory. Dělicí gel byl převrstven *n*-butanolem. Po ztuhnutí dělicího gelu byla pomocí filtračního papíru odsáta vrstva *n*-butanolu a gel byl promyt destilovanou vodou. Poté byl napipetován zaostřovací gel a do gelu byl vložen hřebínek. Zaostřovací gel tuhnul po dobu 50 minut.

Byly připraveny různě koncentrované vzorky  $\beta$ -galaktosidasy (neředěný vzorek, ředěný 1x, 5x, 10x a 100x). Vždy bylo pipetováno 7,5  $\mu$ l vzorku, 7,5  $\mu$ l vzorkovacího pufru a 7,5  $\mu$ l SDS.

Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl vyjmut hřebínek a gel byl přenesen do elektroforetické komory. Do komory byl nalit elektrodový pufr a do jamek bylo napipetováno 5  $\mu$ l standardu a vždy 10  $\mu$ l vzorku. Poté byla elektroforetická komora připojena k napětí 100 V. Jakmile vzorky doputovaly k dělicímu gelu, bylo zvýšeno napětí na 180 V. Po skončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut a přesunut do barvicího roztoku složeného z 0,1% (w/v) barviva Coomasie Brilliant Blue R-250, 15% (v/v) kyseliny octové, 45% (v/v) metanolu a destilované vody. Gel byl ponechán v barvicím roztoku přes noc. Pro odbarvení byl gel přenesen do odbarvovacího roztoku složeného z 10% (v/v) kyseliny octové a 40% (v/v) metanolu. Gel byl odbarvován tři dny. Poté byl gel vyfotografován.

Jako markery byly použity proteinové standardy firmy Sigma-Aldrich. Markery jsou popsány v tabulce 6.



**Tab. 6: Proteinové standardy použité pro SDS-PAGE elektroforézu  $\beta$ -galaktosidasy.**

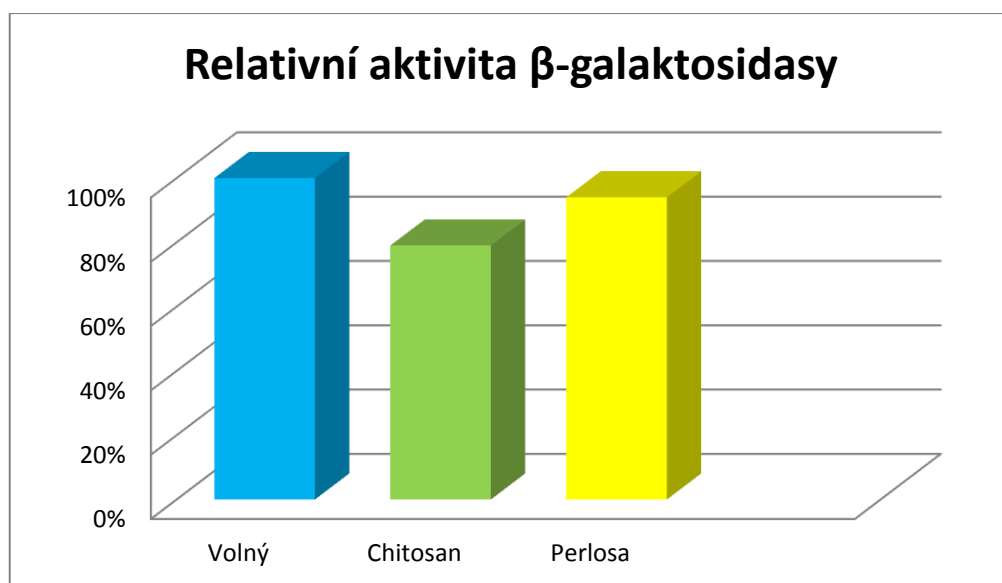
Protein	$M_r$
Myosin, prasečí	200000
$\beta$ -galaktosidasa, <i>E.coli</i>	116000
Fosforylasa b, králičí sval	97000
Albumin, hovězí	66000
Ovalbumin, vaječný bílek	45000
Karboanhydrasa, hovězí erytrocyt	29000

## 4.4. Výsledky a diskuze

### 4.4.1. Porovnání účinnosti imobilizace $\beta$ -galaktosidasy na různých nosičích

Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla stanovena spektrofotometricky použitím umělého substrátu oNPG. Každé měření bylo prováděno ve třech opakováních. Pro měření aktivity volného i imobilizovaného enzymu byl vždy použit 100x zředěný roztok  $\beta$ -galaktosidasy s K-Pi pufrém o objemu 1,4 ml. K imobilizaci bylo použito vždy 50 mg částic.  $\beta$ -galaktosidasa byla imobilizována na magnetické mikročástice a nanočástice. Nejvyšší aktivitu vykazoval volný enzym. Z imobilizovaných enzymů vykazoval nejvyšší aktivitu enzym imobilizovaný na magnetických mikročásticích Perlosa MG 100 modifikovaných celulosou. Jako aktivační činidlo byl použit jodistan sodný. Jodistan sodný aktivuje hydroxylové skupiny celulosy, aby následně mohlo dojít k imobilizaci enzymu. Jako aktivační činidla pro imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy na nanočástice  $Fe_3O_4$  obalené chitosanem byly použity roztoky EDC-HCl a NHS, které aktivují karboxylové skupiny na nanočásticích a umožní navázání enzymu. Chitosan je velice výhodný materiál pro imobilizaci enzymů z mnoha důvodů. Vykazuje vysokou afinitu k proteinům, má dostupné funkční skupiny pro reakci s enzymem a pro různé chemické úpravy, má vysokou odolnost proti chemické degradaci a vykazuje také antibakteriální vlastnosti. Chitosan je také snadno dostupný a levný, protože chitin je po celulose druhým nejrozšířenějším polysacharidem v přírodě (Klein et al., 2012). Grafické znázornění relativních aktivit  $\beta$ -galaktosidasy je na obrázku 10. Jako 100% aktivita byla zvolena aktivita volného enzymu, který byl použit k imobilizaci. Z obrázku je patrné, že

nejvíce výhodná je kovalentní imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy pomocí jodistanu sodného na mikročástice modifikované celulosou.



**Obr. 10: Srovnání aktivit  $\beta$ -galaktosidasy.** Volná  $\beta$ -galaktosidasa (modrá), imobilizovaná  $\beta$ -galaktosidasa na nanočásticích  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obalené chitosanem (zelená), imobilizovaná  $\beta$ -galaktosidasa na mikročásticích Perlosa MG 100 modifikovaných celulosou (žlutá). Na imobilizaci bylo použito vždy 50 mg nosiče. Vždy bylo přidáno 1,4 ml 100x zředěného roztoku  $\beta$ -galaktosidasy.

#### 4.4.2. Vazebná kapacita $\beta$ -galaktosidasy

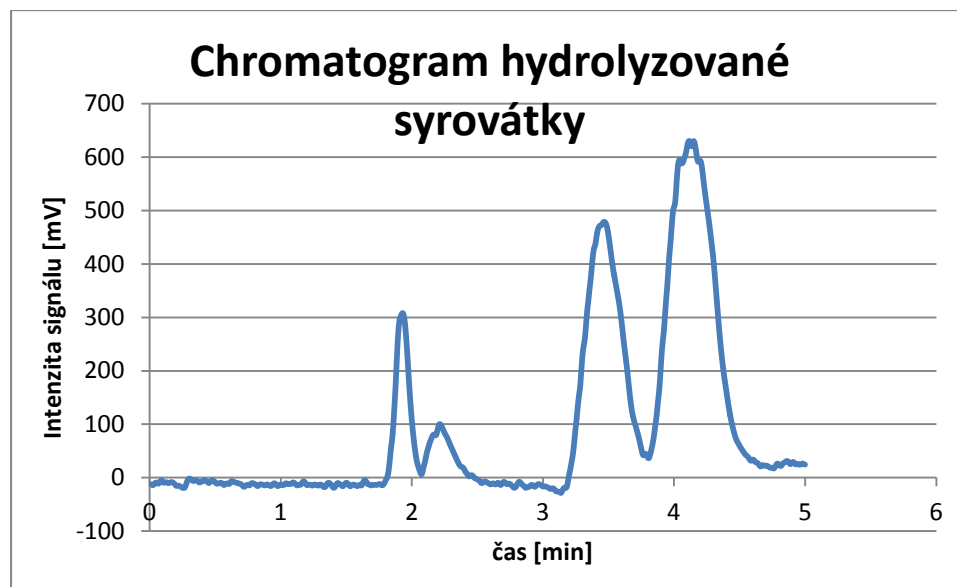
Měřením vazebné kapacity  $\beta$ -galaktosidasy se zjistilo, že na chitosanové nanočástice se navázalo 91,3 %  $\beta$ -galaktosidasy použité k imobilizaci. Již po třetím promytí supernatant neobsahoval žádné bílkoviny. Vysoká vazebná kapacita nanočástic je způsobena jejich velkým povrchem, na který se  $\beta$ -galaktosidasa váže. Nanočástice však mají větší tendenci se shlukovat. Může se tak výrazně snížit povrch nanočástic. Na celulosové mikročástice se navázalo 29,5 %  $\beta$ -galaktosidasy použité k imobilizaci. I zde již po třetím promytí supernatant neobsahoval žádné bílkoviny. Z výsledků stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy je patrné, že i 29,5 % navázaného enzymu je postačující k enzymové reakci. Mikročástice mají menší povrch na imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy. Z tohoto důvodu se na mikročástice navázalo méně enzymu, než se navázalo na nanočástice. Mikročástice však mají menší tendenci

vytvářet shluky. Gulec (2013) imobilizoval  $\beta$ -galaktosidasu z *Kluyveromyces lactis* na membránu acetátu celulosy. Vazebná kapacita takto imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy byla stanovena na 42 % (Gulec, 2013). Vazebná kapacita  $\beta$ -galaktosidasy z *Kluyveromyces lactis* kovalentně imobilizované na nosič Glyoxyl Sepharosu (GS) dosahovala až 99 % (Bernal et al., 2013).

#### 4.4.3. Hydrolýza laktosy v syrovátce $\beta$ -galaktosidasou

$\beta$ -galaktosidasa hydrolyzuje laktosu na glukosu a galaktosu. Metodou HPLC byl sledován úbytek laktosy. Sывátka obvykle obsahuje 4-5 % laktosy. V našem případě vzorek syrovátky obsahoval 4,1 % laktosy. Při hydrolýze laktosy v syrovátce  $\beta$ -galaktosidasou se však často vyskytuje problém, kdy laktosa není hydrolyzována kompletně. Hydrolýza většinou přestane probíhat při zhydrolyzování 70-80 % celkového obsahu laktosy. Problémem by mohla být mikrobiální kontaminace vzorku syrovátky. Přítomnost proteolytických enzymů, především trypsinu, způsobí po určité době kompletní degradaci  $\beta$ -galaktosidasy (Panesar et al., 2006). Z tohoto důvodu byly provedeny dva experimenty hydrolýzy laktosy. Cílem bylo posoudit vliv povaření syrovátky na hydrolýzu laktosy. V prvním experimentu probíhala hydrolýza  $\beta$ -galaktosidasou v nepovařeném vzorku syrovátky, zatímco v druhém experimentu probíhala hydrolýza v povařeném vzorku syrovátky. V případě předem považené syrovátky proběhla hydrolýza velmi úspěšně. Hydrolýza laktosy zde dosáhla 100 %. V případě nepovažené syrovátky hydrolyzovala volná  $\beta$ -galaktosidasa 80,5 % celkové laktosy v syrovátce.

Na obrázku 11 je ukázka chromatogramu hydrolýzy syrovátky imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou na magnetické mikročástice Perlosa MG 100.



**Obr. 11: Chromatogram hydrolyzované syrovátky.** Chromatogram znázorňuje hydrolýzu laktosy imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou na magnetické mikročástice Perlosa MG 100. Retenční čas glukosy a galaktosy je 3,5 min. V tomto čase je vidět pík produktů enzymové reakce. Pík v retenčním čase 4,2 minuty představuje zbývající obsah laktosy ve vzorku syrovátky. Pík v oblasti retenčního času 1,9 minuty představuje nástřik.

Možným vysvětlením, proč v případě předem povařené syrovátky dochází ke kompletní hydrolýze laktosy, zatímco v případě nepovařené syrovátky dochází k méně účinné hydrolýze laktosy, by mohla být denaturace proteolytických enzymů obsažených v syrovátce vysokou teplotou.

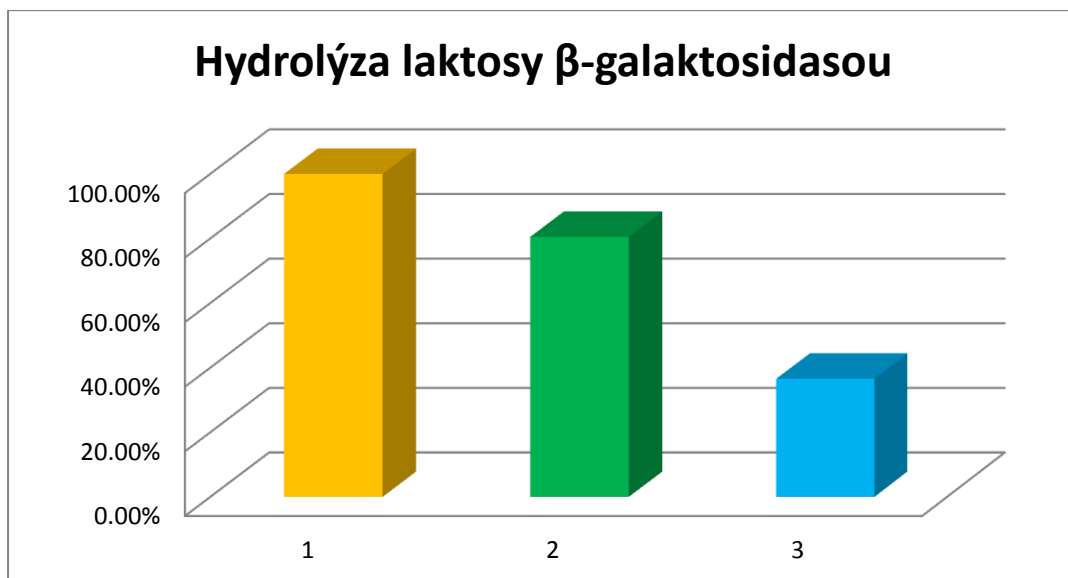
V tabulce 7 jsou obsaženy výsledky hydrolýzy laktosy volnou a imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou. Je zde také zaznamenána plocha píku standardu laktosy, standardu galaktosy a blanku. Blank je vzorek nehydrolyzované syrovátky obsahující pouze laktosu.

**Tab. 7: Plochy píků laktosy a glukosy + galaktosy po manuální integraci.** Lak = laktosa, Gal + Glu = galaktosa a glukosa. Glukosa a galaktosa netvoří dva oddělené píky, ale vytváří společně jeden pík.

Vzorek		Plocha píku [mV s]	c [mg ml <sup>-1</sup> ]
Standard	Lak	5202,5	1,0
Standard	Gal + Glu	14172,5	1,0
Blank	Lak	21530,0	4,1
Volný enzym nepovařený	Gal + Glu	10817,2	0,8
Volný enzym nepovařený	Lak	4398,6	0,2
Volný enzym povařený	Gal + Glu	45307,0	3,2
Volný enzym povařený	Lak	0,0	0,0
Imobilizovaný enzym Perlosa MG 100	Gal + Glu	8693,7	0,6
Imobilizovaný enzym Perlosa MG 100	Lak	13603,9	2,6

V případě imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy došlo k hydrolyze laktosy pouze  $\beta$ -galaktosidasou imobilizovanou na magnetické mikročástice Perlosa MG 100. Tato  $\beta$ -galaktosidasa zhydrolyzovala 36,6 % původního obsahu laktosy.  $\beta$ -galaktosidasa imobilizovaná na magnetické nanočástice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obalené chitosanem nerozštěpila laktosu na glukosu a galaktosu vůbec. Obsah laktosy zde zůstal stejný, jako v původním vzorku syrovátky. Nanočástice během hydrolyzy laktosy vytvářely velké shluky. Hydrolyza tak byla rušena snímáním vzorku z automatického rotátoru za účelem mechanického rozdělení těchto shluků. Srovnání hydrolyzy laktosy volnou a imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou je na obrázku 12. Z obrázku je patrné, že nejúčinnější hydrolyza byla provedena volným enzymem za použití povařené syrovátky. V případě použití nepovařené syrovátky je hydrolyza volnou  $\beta$ -galaktosidasou účinnější, než  $\beta$ -galaktosidasou imobilizovanou.

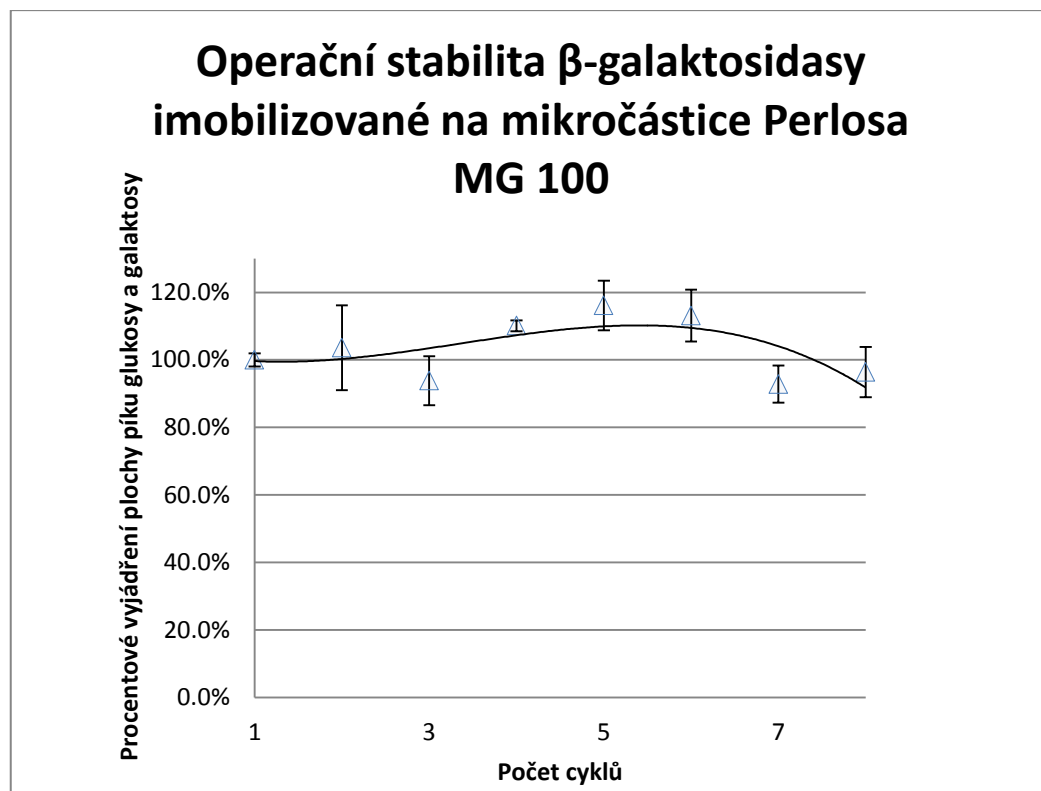
$\beta$ -galaktosidasa imobilizovaná na silanizovaném porózním skle hydrolyzovala 86-90 % laktosy v syrovátce.  $\beta$ -galaktosidasa imobilizovaná na celulosových částicích hydrolyzovala také až 90 % celkové laktosy přítomné v syrovátce (Panesar et al., 2006).



**Obr. 12: Porovnání hydrolýzy laktosy.** Hydrolýza laktosy volnou  $\beta$ -galaktosidasou v povařeném vzorku syrovátky (1), volnou  $\beta$ -galaktosidasou v nepovařeném vzorku syrovátky (2) a imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy na mikročasticích Perlosa MG 100 modifikovaných celulosou v nepovařeném vzorku syrovátky (3).

#### 4.4.3. Operační stabilita imobilizované $\beta$ -galaktosidasy

Operační stabilita imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy byla studována metodou HPLC. Hydrolýza byla provedena v osmi opakováních. Každý cyklus hydrolýzy probíhal 30 minut.  $\beta$ -galaktosidasa imobilizovaná na celulosové mikročastice Perlosa MG 100 vykazovala i po osmém použití téměř 100 % aktivity enzymu při prvním použití. Hodnoty aktivity  $\beta$ -galaktosidasy dosahující více než 100 % mohou být způsobeny chybami v měření či nepřesnou integrací plochy píku. Operační stabilitu  $\beta$ -galaktosidasy imobilizované na celulosové mikročastice znázorňuje obrázek 13.

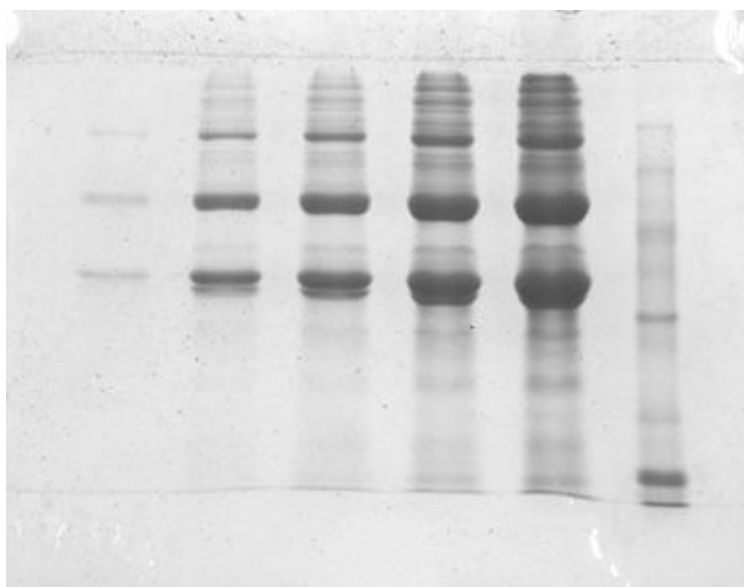


**Obr. 13: Operační stabilita  $\beta$ -galaktosidasy.** Každý cyklus hydrolyzy probíhal po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Byl použit roztok  $\beta$ -galaktosidasy zředěné K-Pi pufrém ( $0,1 \text{ mol l}^{-1}$   $pH$  7) v poměru 1:1. Syrovátka obsahovala hořečnaté ionty o koncentraci  $5 \text{ mmol l}^{-1}$ . Každé měření bylo provedeno ve třech opakováních. Svislé úsečky znázorňují směrodatnou odchylku každého měření.

Klein et al. (2012) studovali operační stabilitu  $\beta$ -galaktosidasy imobilizované na chitosanové makročástice a nanočástice. Zjistili, že i po padesáti opakováních experimentu  $\beta$ -galaktosidasa zhydrolyzovala až 75 % původního obsahu laktosy (Klein et al., 2012).  $\beta$ -galaktosidasa vykazuje velmi vysokou operační stabilitu v procesu hydrolyzy laktosy, což je velmi důležité při aplikaci imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy v biotechnologických procesech při výrobě bezlaktosových mléčných výrobků.

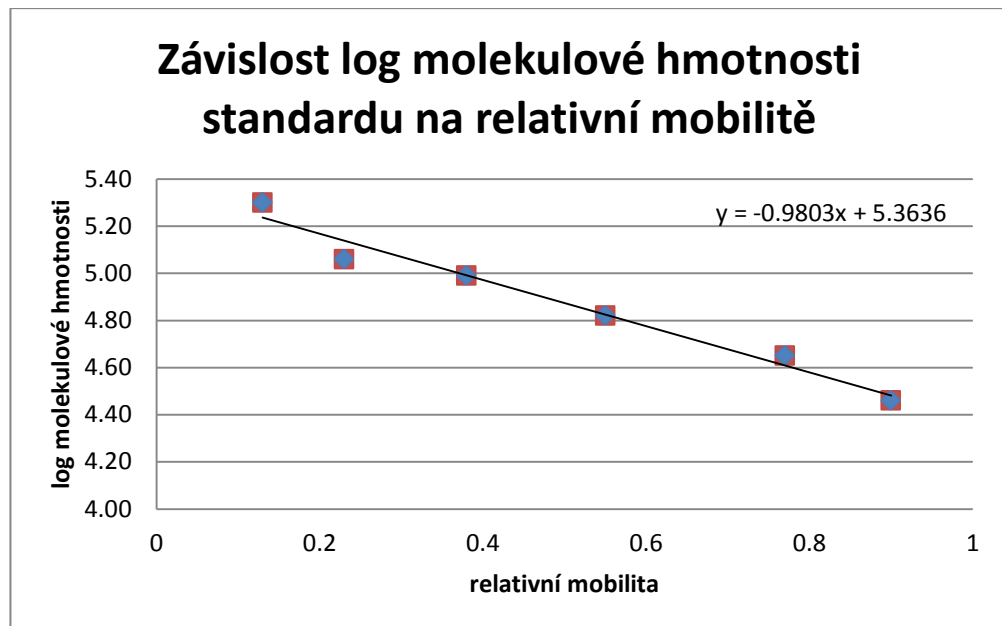
#### 4.4.4. SDS-PAGE elektroforéza $\beta$ -galaktosidasy

Elektroforéza  $\beta$ -galaktosidasy byla provedena za účelem zjištění čistoty roztoku Lactozymu<sup>TM</sup>, který komerčně vyrábí firma Novozymes a dodává firma Sigma Aldrich. Elektroforéza byla provedena s pěti vzorky  $\beta$ -galaktosidasy různě zředěnými s 0,1 mol l<sup>-1</sup> K-Pi pufrem *pH* 7 (neředěný, 1:1, 1:5, 1:10, 1:100). Jako marker byl použit standard od firmy Sigma Aldrich s rozpětím molekulových hmotností 30000-200000 Da. Jednotlivé bandy standardu odpovídají molekulovým hmotnostem 200000, 116000, 97000, 66000, 45000 a 29000 Da. Obrázek 14 znázorňuje výsledek elektroforézy  $\beta$ -galaktosidasy.



**Obr. 14: SDS-PAGE elektroforéza  $\beta$ -galaktosidasy.** Zprava: Marker Sigma Aldrich-200000 Da prasečí myosin, 116000 Da  $\beta$ -galaktosidasa z *E.coli*, 97000 Da králičí fosforylasa b, 66000 Da hovězí albumin, 45000 Da ovalbumin, 29000 Da hovězí karboanhydrasa; neředěný roztok enzymu; roztok enzymu ředěný v poměru 1:1; roztok enzymu ředěný v poměru 1:5; roztok enzymu ředěný v poměru 1:10; roztok enzymu ředěný v poměru 1:100.





**Obr. 15: Vyhodnocení SDS-PAGE elektroforézy.**

Na gelu jsou vidět 4 výrazné bandy. Obrázek 15 ukazuje závislost log molekulové hmotnosti standardu na relativní mobilitě. První band má relativní mobilitu 0,18. Po dosazení do rovnice přímky má tento band molekulovou hmotnost 153674 Da. Druhý výraznější band má relativní mobilitu 0,32. Jeho molekulová hmotnost je tedy 112047 Da. Třetí a čtvrtý band mají relativní mobilitu 0,48 a 0,50. Jejich molekulová hmotnost je 78091 a 74645 Da. Třetí a čtvrtý band jsou v koncentrovanějších vzorcích enzymu spojené do jednoho. Ve vzorku enzymu zředěného v poměru 1:10 a 1:5 jde vidět, že jsou bandy v oblasti molekulové hmotnosti kolem 75000 Da dva. Každý band reprezentuje jednu podjednotku enzymu. Součet molekulových hmotností je tedy dohromady 418457 Da.  $\beta$ -galaktosidasy z různých zdrojů mohou mít odlišnou molekulovou hmotnost. Například molekulová hmotnost  $\beta$ -galaktosidasy z *E. coli* 477575 Da (Juers et al., 2001; Grosová & Rosenberg, 2008).  $\beta$ -galaktosidasa z *E. coli* obsahuje 4 podjednotky a vazebné místo pro hořčičný iont, který je aktivátorem  $\beta$ -galaktosidasy (Penasar et al., 2006).  $\beta$ -galaktosidasa z *Trichoderma reesei* obsahuje celkem šest podjednotek a její molekulová hmotnost je 113765 Da (Maksimainen et al., 2011). Termostabilní  $\beta$ -galaktosidasa z *Thermus thermophilus* je protein s molekulovou hmotností pouze 73365 Da (Hidaka et al., 2002). Ostatní méně výrazné bandy jsou balastní proteiny bez katalytické aktivity, které se během imobilizace také mohou vázat na nosič a způsobovat tak nižší výtěžek imobilizace.

## 5. Závěr

- Byla provedena literární rešerše na téma  $\beta$ -galaktosidasa, imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy a hydrolýza laktosy v syrovátce a mléce  $\beta$ -galaktosidasou.
- Byla stanovena vazebná kapacita  $\beta$ -galaktosidasy. Z celkového množství imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy se na nanočástice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obalené chitosanem navázalo 91,3 % a na mikročástice Perlosa MG 100 29,5 %  $\beta$ -galaktosidasy.
- Jako nejvhodnější nosič pro imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy se ukázaly být mikročástiče Perlosa MG 100. Enzym imobilizovaný na tyto mikročástice vykazoval nejvyšší aktivitu.
- Byla studována hydrolýza syrovátky volnou a imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou metodou HPLC. Byl použit povařený a nepovařený vzorek syrovátky. Volná  $\beta$ -galaktosidasa hydrolyzovala 100 % laktosy v považené syrovátce a 80,5 % v syrovátce nepovažené.  $\beta$ -galaktosidasa imobilizovaná na mikročástice Perlosa MG 100 zhydrolyzovala 36,6 % laktosy obsažené v syrovátce, zatímco hydrolýza laktosy  $\beta$ -galaktosidasou imobilizovanou na nanočástice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obalené chitosanem vůbec neproběhla.
- Studium operační stability  $\beta$ -galaktosidasy imobilizované na mikročástice Perlosa MG 100 vykazuje velmi vysokou operační stabilitu  $\beta$ -galaktosidasy, jelikož i po osmi opakováních hydrolýzy laktosy vykazoval enzym téměř stejnou aktivitu, jakou měl při prvním použití.
- Pro zjištění čistoty roztoku  $\beta$ -galaktosidasy a její molekulové hmotnosti byla provedena SDS PAGE elektroforéza enzymu. Z výsledku elektroforézy jde vidět, že roztok  $\beta$ -galaktosidasy obsahuje řadu balastních proteinů. Tyto proteiny nemají katalytickou aktivitu. Při imobilizaci se však mohou vázat na nosič namísto enzymu a způsobovat tak nižší výtěžek imobilizace. Na gelu jsou výrazné čtyři bandy, které reprezentují čtyři podjednotky  $\beta$ -galaktosidasy. Její molekulová hmotnost byla stanovena na 418457 Da.

## 6. Literatura

Adányi N., Szabó E. E., Váradi M. (1999).

Multi-enzyme biosensors with amperometric detection for determination of lactose in milk and dairy products, *Eur. Food Res. Technol.*, **209**, 220-226.

Baele E. G., Deeb E. A., Handley R. S., Akhavan T. H., Schaap A. P. (1992).

A rapid and simple chemiluminescent assay for *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase, *Biotechniques*, **12**, 320-323.

Bernal C., Marciello M., Mesa M., Sierra L., Fernandez-Lorente G., Mateo C., Guisan J. M. (2013).

Immobilization and stabilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support, *Int. Dairy J.*, **28**, 76-82.

Bravy D., Jordaan J. (2009).

Advances in enzyme immobilization, *Biotechnol Lett*, **31**, 1639-1650.

Brady D., Jordaan J., Simpson C., Chatty A., Arumugam Ch., Moolman F. R. (2008).

Spherezymes: A novel structured self-immobilization enzyme technology, *BMC Biotechnol.*, **8**:8, doi: 10.1186/1472-6750-8-8.

Brons C., Olieman C. (1983).

Study of the high-performance liquid chromatographic separation of reducing sugars, applied to the determination of lactose in milk, *J. Chromatogr. A*, **259**, 79-86.

Brown W. H., Foote Ch. S., Iverson B. L., Anslyn E. V. (2009).

Organic chemistry, Brooks Cole, USA, pp. 1052.

Buchholz G., Kasche V., Bornscheuer U. T. (2005).

Biocatalysts and enzyme technology, Wiley-VCH Weinheim 2005., pp. 11-14.

Cvak, Z., Peterková, L., Černá, E. (1992).

Chemické a fyzikálně - chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků, 1. vydání, VÚPP, Středisko potravinářských informací, Praha, 221.

Doležálek, J., Hladík, J., Březina, P. (1980).

Příručka pro cvičení z chemie a technologie mléka. 1. vyd. SNTL Praha, pp. 210.

El-Aassar M. R., Al-Deyab S. S., El-Refaie Kenawy (2013).

Covalent immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto electrospun nanofibres of poly (AN-co-MMA) copolymer, *J. Appl. Polym. Sci.*, **127**, 1873-1884.

Euber J. R., Brunner J.R. (1983).

Determination of lactose in milk products by high-performance liquid chromatography, *J. Dairy Sci.*, **62**, 685-690.

Fasciotti M., Sanvido G. B., Santos V. G., Lalli P. M., McCullagh M., de Sá G. F., Daroda J. R., Peter M. G., Eberlin M. N. (2012).

Separation of isomeric disaccharides by traveling wave ion mobility mass spectrometry using CO<sub>2</sub> as drift gas, *J. Mass Spectrom.*, **47**, 1643-1647.

Fernandes S., Geueke B., Delgado O., Coleman J., Hatti-Kaul R. (2002).

$\beta$ -Galaktosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolyses, *Appl. Microbiol. Biotechnol.***58**, 313-321.

Fueller C. W., Rubin J. R., Bright H. J. (1980).

A simple procedure for covalent immobilization of NADH in a soluble and enzymically active form, *Eur. J. Biochem.*, **103**, 421-430.

Garret R. H., Grisham CH. H. (2010).

Biochemistry, Fifth Edition, Nakladatelství Brook/Cole, Belmont, USA, pp 129.

Goetz V., Remaud M., Graves D. J. (1991).

A novel magnetic silica support for use in chromatographic and enzymatic bioprocessing, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 614-626.

Greenberg N. A., Mahoney R.R. (1982).

Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*, *J. Food. Sci.*, **47**, 1824-1828.

Grossová Z., Rosenberg M., Rebroš M. (2008).

Perspectives and applications of immobilised  $\beta$ -galactosidase in food industry – a review, *Czech J. Food Sci.*, **26**, 1-1.

Guidini C. Z., Fischer J., Santana L. N. S., Cardoso V. L., Ribeiro E. J. (2010).

Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking, *Biochem. Eng.*, **52**, 137-143.

Gulec H. A. (2013).

Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: Effect of surface characteristics, *Colloid Surface B*, **104**, 83-90.

Gutierrez L. F., Hamoudi S., Belkacemi H. (2012).

Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications, *Int. Dairy J.*, **26**, 103-111.

Hejtmánková A., Tesař V., Dragounová H., Toušová R., Louda F. (2002).

Obsah laktosy v mléce a vybraných mléčných výrobcích, *Sborník referátů z mezinárodní konference ČZU, Praha*, 30-32.

Hidaka M., Fushinobu S., Ohtsu N., Motoshima H., Matsuzawa H., Shoun H., Wakagi T. (2002).

Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42  $\beta$ -galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galaktose, *J. Mol. Biol.*, **322**, 79-91.

Horner T. W., Dunn M. L., Eggett D. L., Ogden L. V. (2011).

$\beta$ -galactosidase activity on commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures, *J. Dairy Sci.*, **94**, 3242-3249.

<http://www.chempoint.cz/kapilarni-elektroforeza-jako-ucinna-a-snadna-analyticka-metoda-stanoveni-jednoduchych-latek> [7.3.2013]

Husain Q., Ansari S. A., Alam F., Azam A. (2011).

Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galaktosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism, *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 37-43.

Chibata I. (1978).

Immobilised enzyme – research and development, John Wiley and Sons Inc., New York, USA, pp. 108 – 147.

Jordaan J., Mathye S., Simpson C., Brady D. (2009).

Improved chemical and physical stability of laccase after spherezyme immobilisation, *Enzyme Microb. Technol.*, **45**, 432-435.

Jovanovic-Malinovska R., Fernandes P., Winkelhausen E. (2012).

Galacto-oligosaccharides synthesis from lactose and whey by  $\beta$ -galactosidase immobilised in PVA, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **168**, 1197-1211.

Juers D. H., Jackson R. H., Wigley D., Zhang X. J., Huber R. E., Tronrud D. E., Matthews B. W. (2000).

High resolution refinement of  $\beta$ -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for  $\alpha$ -complementation, *Protein Sci.*, **9**, 1685-1699.

Juers D. H., Heightman T. D., Vasella A., McCarter J. D., Mackenzie L., Withers S. G., Matthews B. W. (2001).

A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*)  $\beta$ -galactosidase, *Biochemistry*, **40**, 14781-14794.

Kim C. S., Ji E. S., Oh D. K. (2004).

A new kinetic model of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces Laris* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 738-743.

Klein M. P., Nunes M. R., Rodrigues R. C., Benvenuti E. V., Costa T. M. H., Hertz P. F., Ninow J. L. (2012).

Effect of the support size on the properties of  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan: advantages and disadvantages of macro and nanoparticle, *Biomacromolecules*, **13**, 2456-2464.

Klibanov A. M. (1997).

Why are enzymes less active in organic solvents than in water?, *Trends Biotechnol.*, **15**, 97-101.

Klouda P. (2000).

Základy biochemie, 1 vyd., nakladatelství Pavel Klouda, pp. 155.

Klouda P. (2003a).

Moderní analytické metody. Vydavatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003, str. 84-88.

Klouda P. (2003b).

Moderní analytické metody. Vydavatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003, str. 11.

Klouda P. (2003c).

Moderní analytické metody. Vydavatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003, str. 24-26.

Kreft M. E., Jelen P. (2000).

Stability and activity of  $\beta$ -galactosidase in sonicated cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* 11842 affected by temperature and ionic environments, *J. Food Sci.*, **65**, 1364-1368.

Latha C. (2007).

Nutritional significance of designer milk, *Intas. Polivet.*, **8**, 128-133.

Legarová V. (2011).

Posouzení kvality sladké syrovátky vzhledem k možnosti využití pro potravinářské účely, *Disertační práce*, ČZÚ Praha, 26-27.

Legarová V., Kouřimská L. (2011).

Metody sledování změň obsahu laktosy a dalších analytů během fermentace syrovátky, *Chem. Listy* **105**, 869-873.

Maksimeinen M., Hakulinen N., Kallio J. M., Timoharju T., Turunen O., Rouvinen J. (2011).

Crystal structures of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -galactosidase reveal conformational changes in the active site, *J. Struct. Biol.*, **174**, 156-163.

Matthews B. W. (2005).

The structure of *E.coli*β-galactosidase, *C.R.Biologies*, **328**, 549 – 556.

McMurry J. (2007).

Organická chemie, Nakladatelství VŠCHT v Praze, pp. 968-969.

Mlichová Z., Rosenberg M. (2006).

Current trends of β-galactosidase application in food technology, *J. Food Nutr. Res.***45**, 47-54.

Nelson J. M., Griffin E. G. (1916).

Adsorption of invertase, *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 1109-1115.

Newel H. E., Buckton G., Butler D. A., Thielmann F., Williams D. R. (2001).

The use of inverse phase gas chromatography to measure the surface energy of crystalline, amorphous and recently milled lactose, *Pharm. Res.*, **18**, 662-666.

Nichele V., Signoretto M., Ghedini E. (2011).

β-galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance, *J. Mol. Catal. B-Enzym.***71**, 10-15.

Panesar P. S., Panesar R., Singh R. S., Kennedy J. F., Kumar H. (2006).

Microbial production, immobilization and applications of β-D-galactosidase, *J. Chem. Technol. Biot.*, **81**, 530-543.

Sen S., Ray L., Chattopadhyay P. (2012).

Production, Purification, Immobilization, and Characterization of a Thermostable β-Galactosidase from *Aspergillus alliaceus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **167**, 1938-1953.

Shah N. P., Jelen P. J. (1991).

Lactase activity and properties of sonicated dairy cultures, *Milchwissenschaft*, **46(9)**, 570-573.

Shortt C., O'Brien J. (2004).

Handbook of functionalized dairy products, CRS Press, pp. 293.



- Stránský, M., Sieber, R., de Vrese, M. (2007).  
Lactose in Nutrition, *Občanské sdružení pacientů s IBD: Crohn. cz [online]*.
- Torres P., Batista-Viera F. (2012).  
Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans*  $\beta$ -galaktosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **83**, 57-64.
- Ustok F. I., Tari C., Harsa S. (2010).  
Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures, *Food Chem.*, **119**, 1114-1120.
- Vasileva N., Lotov V., Ivanov Y., Godjevargova T., Kotia N. (2012).  
Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on modified polypropylene membranes, *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 710-719.
- Verma M. L., Barrow C. J., Kennedy J. F., Puri M. (2012).  
Immobilization of  $\beta$ -D-galactoside from *Kluyveromyces Laris* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis, *Int. J. Biol. Macromol.*, **50**, 432-437.
- Volesky B., Emond C. (1979).  
Continuous-flow monitoring of lactose concentration, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1251.
- Whittier, E. O. (1944).  
Lactose and its utilization-a review, *J. Dairy Sci.*, **27**, 505-537.
- Wu Z., Dong M., Lu M., Li Z. (2010).  
Encapsulation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* based on „fish-in-net“ approach with molecular imprinting technique, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **63**, 75-80.

## 7. Použité zkratky

APS	Amonium persulfát
EDC-HCl	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylkarbodiimid hydrochlorid
K-Pi	K-Fosfátový pufr
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
<i>o</i> -NP	<i>Ortho</i> -nitrofenol
<i>o</i> -NPG	<i>Ortho</i> -nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
SDS	Dodecylsulfát sodný
TEMED	Tetramethylethylendiamin
X-gal	5-bromo-4-chlor-3- $\beta$ -indoyl-D-galaktopyranosid