

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-3-2590>
<https://elibrary.ru/EJREBB>

Обзорная статья
<https://fppt.ru>

Особенности получения галактоолигосахаридов с использованием дрожжей *Kluyveromyces*



С. А. Рябцева*, М. А. Шпак, С. Н. Сазанова

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Поступила в редакцию: 18.06.2025

Принята после рецензирования: 21.07.2025

Принята к публикации: 05.08.2025

*С. А. Рябцева: ryabtseva07@mail.ru,

<https://orcid.org/0000-0001-9803-8709>

М. А. Шпак: <https://orcid.org/0000-0002-0119-9061>

С. Н. Сазанова: <https://orcid.org/0000-0002-8200-3007>

© С. А. Рябцева, М. А. Шпак, С. Н. Сазанова, 2025



Аннотация.

Галактоолигосахариды обладают пребиотической активностью, их получают из лактозы с использованием бета-галактозидаз бактериального или грибного происхождения. Цель обзора – выявление и анализ факторов, влияющих на биосинтез и очистку галактоолигосахаридов, с использованием бета-галактозидаз дрожжей рода *Kluyveromyces*, а также перспективных направлений исследований в этой области.

Объектами исследования стали научные публикации по вопросам получения галактоолигосахаридов с использованием бета-галактозидаз дрожжей. Для поиска информации были использованы международные базы данных Scopus, Web of Science, PubMed, eLIBRARY.RU. Для анализа было отобрано 87 источников, в основном статьи в рецензируемых журналах, опубликованные преимущественно за последние 10 лет.

Выбор фермента и формы его применения, оптимизация условий биосинтеза и очистки являются наиболее важными для регулирования выхода, состава и свойств анализируемых веществ. Бета-галактозидазы из *Kluyveromyces* могут одновременно катализировать реакции гидролиза и трансгалактозилирования. Условия протекания процессов биосинтеза галактоолигосахаридов с этими ферментами широко варьируют в разных публикациях, как и их выход, но чаще всего этот показатель не превышает 30–40 %, при этом общая конверсия лактозы достигает 80–90 %. Применение бета-галактозидаз *Kluyveromyces* в виде целноклеточных ферментов, в иммобилизованной форме или совместно с другими ферментами позволяет улучшить экономические показатели процессов биосинтеза и / или выход и / или структуру рассматриваемых веществ. Прямой их синтез в молоке или сыворотке дает возможность получать новые функциональные молочные продукты и добавки. Селективная биоконверсия с дрожжами *Kluyveromyces* позволяет повысить чистоту галактоолигосахаридов до 90 % экономически выгодным и экологически безопасным путем.

К перспективным направлениям можно отнести использование побочного молочного сырья для получения продуктов с галактоолигосахаридами, комбинированное применение ферментов разных продуцентов, а также комплексное применение бета-галактозидаз *Kluyveromyces* для их биосинтеза и очистки.

Ключевые слова. Лактоза, бета-галактозидазы, *Kluyveromyces*, трансгалактозилирование, гидролиз, молочная сыворотка, очистка

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-26-20093, <https://rscf.ru/project/25-26-20093/>

Для цитирования: Рябцева С. А., Шпак М. А., Сазанова С. Н. Особенности получения галактоолигосахаридов с использованием дрожжей *Kluyveromyces*. Техника и технология пищевых производств. 2025. Т. 55. № 3. С. 581–606. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-3-2590>

Production of Galacto-Oligosaccharides Using *Kluyveromyces* Yeast



Svetlana A. Ryabtseva*^{ORCID}, Maria A. Shpak^{ORCID}, Serafima N. Sazanova^{ORCID}

North-Caucasus Federal University^{ORCID}, Stavropol, Russia

Received: 18.06.2025
Revised: 21.07.2025
Accepted: 05.08.2025

*Svetlana A. Ryabtseva: ryabtseva07@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-9803-8709>
Maria A. Shpak: <https://orcid.org/0000-0002-0119-9061>
Serafima N. Sazanova: <https://orcid.org/0000-0002-8200-3007>

© S.A. Ryabtseva, M.A. Shpak, S.N. Sazanova, 2025



Abstract.

Galacto-oligosaccharides are known for their prebiotic activity. They are obtained from lactose using bacterial or fungal beta-galactosidases. This article describes the factors that affect the biosynthesis and purification of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces* yeasts, as well as summarizes some prospective research areas in this sphere.

The research covered ten years of scientific publications on the production of galacto-oligosaccharides with yeast beta-galactosidases. The review pool included 87 articles published in peer-reviewed journals and registered in Scopus, Web of Science, PubMed, and eLIBRARY.RU.

The yield, composition, and properties of galacto-oligosaccharides depend on the enzyme, its application, biosynthesis optimization, and purification conditions. Beta-galactosidases from *Kluyveromyces* can simultaneously catalyze hydrolysis and transgalactosylation reactions. The biosynthesis conditions vary a lot across the review pool, as does the yield of galacto-oligosaccharides, which usually remains below 30–40% while the total lactose conversion reaches 80–90%. *Kluyveromyces* beta-galactosidases can be used as whole-cell enzymes in immobilized form or together with other enzymes. They improve the economic indicators of biosynthesis, and / or the yield and / or the structure of galacto-oligosaccharides. If synthesized directly in milk or whey, galacto-oligosaccharides may yield new functional dairy products and additives. The method of selective bioconversion with *Kluyveromyces* yeast brings the purity of galacto-oligosaccharides up to 90% in an economical and sustainable way.

Eventually, galacto-oligosaccharides can be obtained from dairy by-products. Other promising areas include the enzymic mixes of different producers, as well as a comprehensive use of *Kluyveromyces* beta-galactosidases for galacto-oligosaccharide biosynthesis and purification.

Key words. Lactose, beta-galactosidases, *Kluyveromyces*, transgalactosylation, hydrolysis, whey, purification

Funding. The work was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 25-26-20093, <https://rscf.ru/project/25-26-20093/>

For citation: Ryabtseva SA, Shpak MA, Sazanova SN. Production of Galacto-Oligosaccharides Using *Kluyveromyces* Yeast. Food Processing: Techniques and Technology. 2025;55(3):581–606. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-3-2590>

Введение

Галактоолигосахаридами (ГОС) называют биополимеры углеводной природы, состоящие в основном из галактозных остатков и обладающие пребиотической активностью. ГОС не расщепляются ферментами человека и стимулируют развитие бифидобактерий и другой сахаролитической кишечной микробиоты, вырабатывающей короткоцепочечные жирные кислоты и ряд других полезных метаболитов. Способность ГОС оказывать благоприятное воздействие на здоровье человека доказана многочисленными исследованиями, как лабораторными, так и клиническими [1].

Впервые ГОС начали применять в Японии в 1995 г., когда они были узаконены в качестве пищи для здоро-

вого питания, согласно системе сертификации FOSHU. В настоящее время уже девять ГОС-содержащих ингредиентов имеют международный статус безопасности GRAS и могут быть использованы в производстве разнообразных пищевых продуктов. Эта группа пребиотиков наиболее близка по структуре и свойствам к олигосахаридам женского молока, поэтому прежде всего нашла применение в производстве смесей для младенцев. Сфера использования ГОС постоянно расширяется благодаря их низкой калорийности, сладости, хорошей растворимости, устойчивости к температуре и pH [1, 2]. Сегментация рынка ГОС включает функциональные продукты питания и напитки, детские смеси, пищевые и кормовые добавки, фармацевтические препараты

с общим объемом реализации в 510 млн долларов за 2024 г. По прогнозам, среднегодовой темп роста составит 13,4 % в последующие 10 лет [3].

Анализ библиографической карты (рис. 1), полученной с использованием VOSviewer 1.6.20 и базы данных PubMed, позволил выделить основные направления исследований в области изучения ГОС. Ученые активно занимаются вопросами применения ГОС для изменения микробиоты кишечника младенцев и беременных женщин, в т. ч. с целью предупреждения аллергии (зеленый кластер), а также тесно связанной с темой повышения иммунитета, предупреждения запоров и колитов (голубой кластер). К важным объектам исследований относятся механизмы улучшения абсорбции железа (фиолетовый кластер), профилактики и лечения колоректального рака, ожирения и депрессии (синий кластер) у взрослых людей. Актуальным направлением остается совершенствование процессов получения ГОС с использованием бета-галактозидаз (лактаз, ЕС 3.2.1.23) для трансгалактозилирования лактозы, при этом значительное внимание уделяется процессам очистки и иммобилизации ферментов (желтый и красный кластеры).

В настоящее время в литературе можно найти информацию о различных видах ГОС, включая альфа-, бета-, фрукто-, гуманизированные и другие ГОС [4–7]. В большинстве источников (и в данном обзоре) под тер-

мином ГОС подразумевают смесь олигосахаридов, состоящих из нескольких молекул галактозы и одной молекулы глюкозы, соединенных бета-связями преимущественно со степенью полимеризации от 2 до 8 и получаемых из лактозы с использованием бета-галактозидаз (т. е. бета-ГОС).

Возможность использования для производства ГОС побочного сырья, содержащего лактозу, является привлекательной для молокоперерабатывающих предприятий, т. к. эта группа пребиотиков имеет высокую добавленную стоимость и востребована на рынке продуктов функционального питания [8]. Для биосинтеза ГОС из лактозы применяют бета-галактозидазы бактериального или грибного происхождения, обладающие способностью не только к гидролизу лактозы, но и переносу галактозильного остатка (трансгалактозилирование). Свойства бета-галактозидаз и условия проведения ферментации оказывают влияние на структуру ГОС, которая определяет возможность их участия в метаболизме полезной микробиоты кишечника [7, 9–11].

В качестве применяемых для синтеза ГОС продуцентов бета-галактозидаз в публикациях упоминают более 40 видов различных микроорганизмов. Из прокариот используют виды архей, актинобактерий (в т. ч. рода *Bifidobacterium*), фирмикутов (такие как *Bacillus*, *Lactobacillus* и т. д.), протеобактерий (в т. ч. *Escherichia*). Среди эукариот исследовали представителей

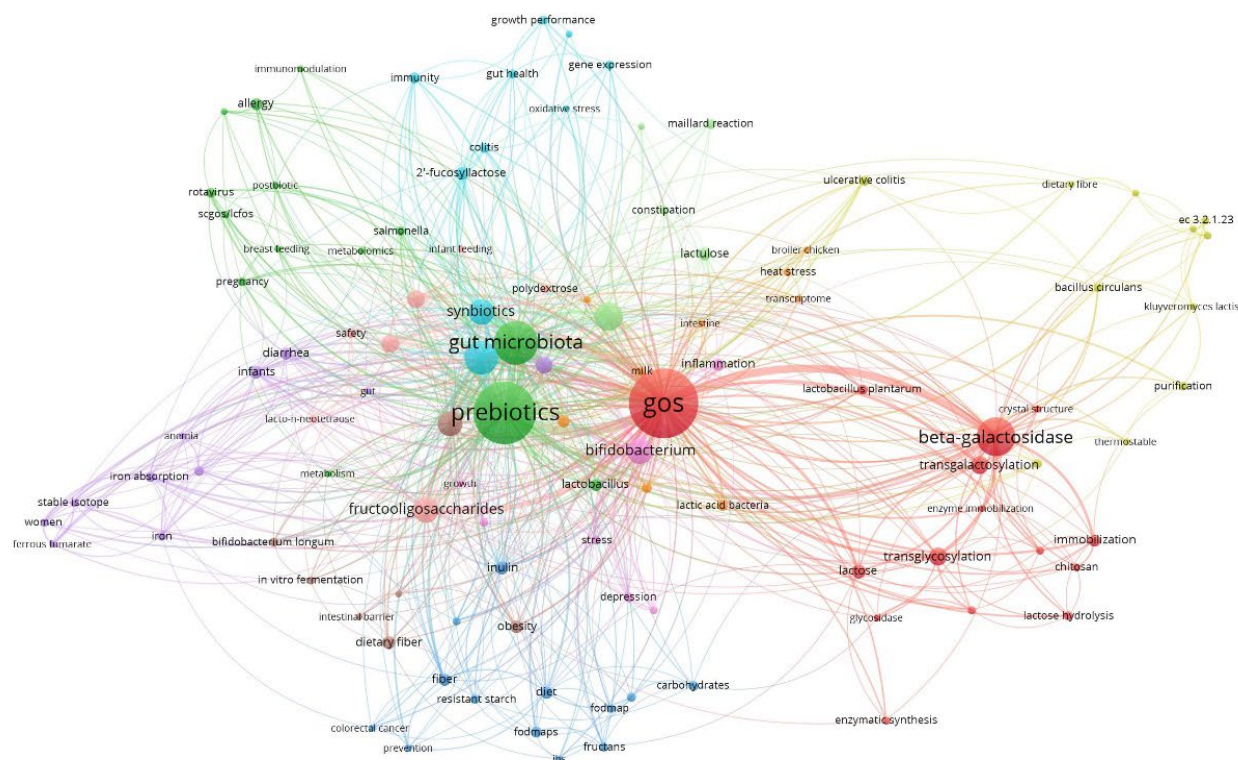


Рисунок 1. Библиографическая карта, построенная на основе данных PubMed по ключевому слову “galactooligosaccharides” (gos) с использованием VOSviewer 1.6.20

Figure 1. PubMed publications on galacto-oligosaccharides: bibliographic map, VOSviewer 1.6.20

классов аскомицетных (например, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Kluyveromyces*) и базидиомицетных (*Sporobolomyces* и др.) грибов [1, 2, 9, 12, 13]. К наиболее часто применяемым при получении ГОС продуцентам относятся спорообразующие палочки *Bacillus circulans*, молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum* и дрожжи *Kluyveromyces lactis* (рис. 1).

Бета-галактозидазы лактозосбраживающих дрожжей рода *Kluyveromyces* имеют ряд преимуществ по сравнению с ферментами других продуцентов: они хорошо изучены в плане структуры и механизмов действия, имеют доказанную безопасность, длительную историю применения в пищевой промышленности и биотехнологии, значительные объемы производства в разных странах, высокую активность в лактозосодержащем сырье [10, 14]. Еще один аспект, выделяющий эти дрожжи из ряда других продуцентов – возможность их использования не только для биосинтеза, но и в процессах очистки ГОС от лактозы и моносахаридов [9, 12]. В российских коллекциях промышленных микроорганизмов имеется много видов и штаммов *Kluyveromyces*, исследования их бета-галактозидазной активности в нашей стране продолжаются [15–17], что важно для обеспечения технологического суверенитета.

Цель обзора – выявление и анализ факторов, влияющих на биосинтез и очистку ГОС, с использованием лактозосбраживающих дрожжей рода *Kluyveromyces*, а также перспективных направлений исследований в этой области.

Объекты и методы исследования

Объекты исследования – научные публикации по вопросам получения галактоолигосахаридов с использованием бета-галактозидаз дрожжей. Для поиска

информации были использованы международные базы данных Scopus, Web of Science, PubMed, eLIBRARY за период с 1965 по 2025 г. Материалы конференций, монографии и учебники в качестве источников информации не рассматривали.

Для анализа было отобрано 87 источников, в основном статьи в рецензируемых высокорейтинговых журналах, опубликованные преимущественно за последние 10 лет (в т. ч. 44 – за последние 5 лет).

Результаты и их обсуждение

Основные процессы и механизмы получения галактоолигосахаридов. В известных способах производства препаратов галактоолигосахаридов (ГОС), имеющих статус безопасности GRAS, в т. ч. с использованием ферментов *Kluyveromyces*, можно выделить четыре основных блока. Эти блоки включают процессы подготовки разных видов сырья, содержащих лактозу, ее биотрансформацию в ГОС и завершающие операции, направленные на повышение концентрации определенных фракций ГОС и хранимостепособности готовых продуктов (рис. 2).

В качестве сырья для крупномасштабного производства ГОС, как правило, используют рафинированную лактозу, т. к. затраты на нее могут быть меньше, чем стоимость очистки побочного молочного сырья от белковых и минеральных компонентов, которая может составлять более половины общей себестоимости продукта [12]. Однако глубокой переработке молочной сыворотки уделяется все больше внимания в связи с ее низкой стоимостью и экологическими проблемами ее сброса. Обычно сыворотку сначала подвергают фракционированию с помощью баромембранного процесса ультрафильтрации. Отделенные сывороточные

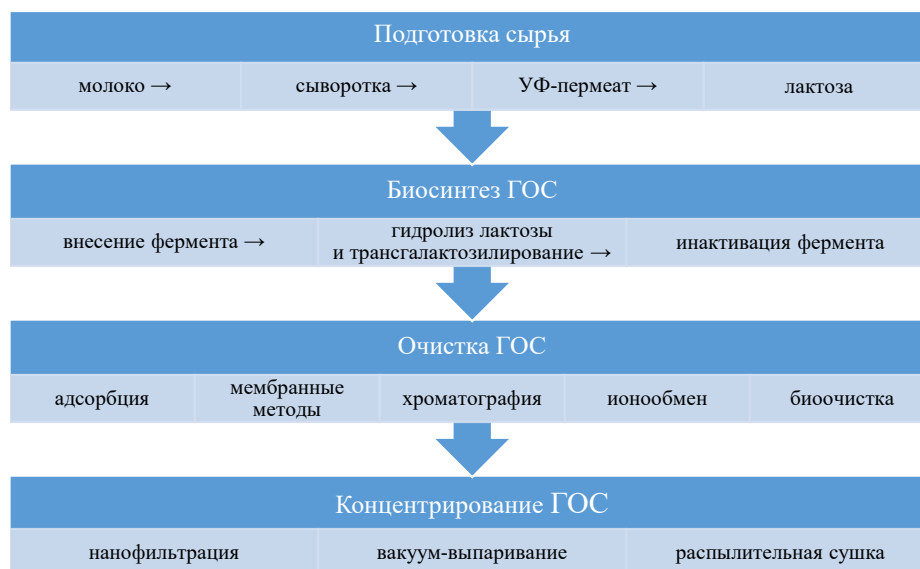


Рисунок 2. Основные процессы получения галактоолигосахаридов

Figure 2. Processes of galacto-oligosaccharide production

белки используют для обогащения пищевых продуктов, а полученный фильтрат (УФ-пермеат) иногда после деминерализации – для получения лактозы или ее производных, например ГОС [8]. Натуральные молоко и сыворотка могут быть использованы также как среда для биосинтеза и получения неочищенных ГОС-содержащих продуктов [18–20].

После приготовления концентрированного раствора лактозы (20–40 %) в горячей воде ($> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ для преодоления порога растворимости) проводят регулирование pH и температуры раствора до значений, оптимальных для синтеза ГОС. Теоретически ГОС можно получить из лактозы путем химического гидролиза и полимеризации моносахаридов в сильноокислых ($\text{pH} \leq 1,5$) средах при высоких температурах ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Кроме применения агрессивных сред и энергетических затрат, этот метод имеет еще один существенный недостаток – невозможность контроля региоселективности получаемых в олигосахаридах связей [21]. Для ГОС важно наличие бета-гликозидных связей, потому что именно они делают эти вещества неперевариваемыми. Это является одним из основных требований к пребиотикам. Применение в качестве катализаторов трансгалактозилирования бета-галактозидаз позволяет сохранить бета-связи между моносахаридными остатками, поэтому все известные промышленные способы получения ГОС основаны на такой реакции [12].

Биотрансформация лактозы под действием бета-галактозидазы начинается с образования их комплекса, в котором активный сайт фермента связан с галактозным остатком. После разрыва связи между моносахаридами и отделения глюкозы галактоза остается связанной с бета-галактозидазой в форме галактозил-ферментного комплекса. Если активность воды высокая, он может гидролизиться с выделением галактозы. В концентрированных углеводных растворах бета-галактозидаза может играть роль не только гидролазы, но и псевдо-трансферазы, перенося остаток галактозы на другие углеводы и формируя с ними бета-связи. При этом могут получаться как дисахариды с отличным от лактозы строением, так и более сложные олигосахариды со степенью полимеризации 3–10. Реакции трансгалактозилирования с гидролазами подчиняются закономерностям кинетически контролируемого синтеза, при котором состав получаемых ГОС будет определяться прежде всего структурой фермента. На выход ГОС будет влиять не только активность фермента, определяемая его происхождением, степенью очистки и формой применения (свободная, иммобилизованная), но и фактор времени, потому что для таких процессов характерны кратковременные максимальные выходы целевых продуктов, зависящие от соотношения скоростей синтеза и гидролиза углеводов [1, 14, 22].

Традиционно биосинтез ГОС проводят в реакторах периодического действия с мешалкой. Окончание реакций обычно контролируется инактивацией фермента при помощи нагревания или изменения pH [9, 12].

Для продления срока службы биокатализаторов применяют непрерывные процессы с иммобилизацией ферментов в реакторах с неподвижным слоем и фиксированной каталитической мембраной, а также ферментативные мембранные реакторы. Получение ГОС в них осуществляют свободным или иммобилизованным ферментом в реакторе с мешалкой, соединенном с внешним мембранным модулем, благодаря чему достигают одновременного фракционирования смеси. Несмотря на то что такой подход считается многообещающей альтернативой периодическим процессам, возможное загрязнение мембраны и потеря активности фермента в течение длительной эксплуатации сдерживают широкое применение ферментативных мембранных реакторов [22].

Получаемые в результате ферментации смеси имеют сложный состав. В основном это растворы моно-, ди-, три- и тетра-сахаридов, но обнаружены и более сложные олигосахариды. Количество разных по структуре углеводов, отличающихся по степени полимеризации и бета-связям, может достигать 30–40 [4, 23, 24], а по данным Logtenberg *et al.* [25], более 100, в зависимости от применяемого фермента и условий реакции.

Хотя в последние годы получены доказательства пребиотической активности некоторых дисахаридов, общепризнанными пребиотиками считаются ГОС со степенью полимеризации 3–6 [9, 12]. Лактоза нежелательна для людей с лактазной недостаточностью, а глюкоза – для диабетиков. Кроме того, лактозу нужно удалять для предотвращения ее кристаллизации в пересыщенных растворах, а моносахариды повышают калорийность и гигроскопичность получаемых продуктов ГОС. В растворе также находится инактивированный фермент, могут присутствовать остаточные белковые и минеральные компоненты лактозосодержащего сырья, соли металлов-лигандов, органические и неорганические кислоты, использованные для регулировки pH. Как правило, на первом этапе очистки удаляют неуглеводные вещества, на втором – проводят разделение углеводов по их молекулярной массе, на третьем – по заряду. Для повышения степени чистоты ГОС используют различные методы: ионообмен, адсорбцию, хроматографию, баро- и электромембранные технологии, экстракцию сверхкритическими жидкостями, кристаллизацию и осаждение, а также селективную ферментацию [12, 26].

Баромембранное разделение давно и широко применяется в пищевой промышленности и биотехнологии, т. к. обеспечивает непрерывную работу, масштабируется и позволяет настроить гибридные операции. К недостаткам таких процессов относят небольшой срок службы мембран и оборудования в целом, относительно низкие селективность и поток, возможность загрязнения мембраны (в т. ч. в результате обрастания биопленками) и явление концентрационной поляризации [26]. Микрофльтрация (размер пор мембраны – 0,1–10 мкм) в основном используется для уменьшения

количества микроорганизмов, для фракционирования и удаления частиц остатков клеток из суспензии, а также в качестве операции предварительной обработки перед ультрафильтрацией. Саму ультрафильтрацию (размер пор – 0,001–0,1 мкм) применяют для удаления макромолекул белков, а также для одновременного синтеза ГОС и фракционирования углеводов с использованием мембранного биореактора [27, 28]. Нанофильтрация (размер пор – 0,0001–0,001 мкм) позволяет удалить из раствора некоторую влагу и фракционировать углеводы с разной молекулярной массой, однако этот показатель близок для моно- и дисахаридов, поэтому очистка от них достигается лишь частично [29].

Метод селективной ферментации основан на применении микроорганизмов и / или их ферментов, способных выборочно утилизировать нежелательные углеводы во время / после биосинтеза ГОС. Эта возможность привлекает внимание ученых и производителей в силу простого аппаратного оформления, экономической эффективности и экологической безопасности. Известно применение с этой целью различных дрожжей, плесеней и молочнокислых бактерий в виде клеток или их ферментов в свободной или иммобилизованной форме [12, 26]. Если хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* могут довольно быстро утилизировать моносахариды, то лактозосбраживающие дрожжи *Kluyveromyces* используются для ферментации моносахаридов и лактозы с достижением высокой степени очистки ГОС [9]. Это позволило внедрить применение *Kluyveromyces* в промышленное производство.

После очистки проводят концентрирование ГОС с использованием традиционных для пищевой промышленности процессов вакуум-выпаривания с получением сиропов. Для производства порошкообразных ГОС перед распылительной сушкой вносят вещества, снижающие гигроскопичность продукта (мальтодекстрины или белки) [2].

Таким образом, выбор фермента и формы его применения, оптимизация условий биосинтеза и очистки являются наиболее важными для регулирования выхода, состава и свойств галактоолигосахаридов.

Факторы, влияющие на биосинтез галактоолигосахаридов с использованием дрожжей *Kluyveromyces*. Происхождение, структура и свойства бета-галактозидаз. Бета-галактозидазы (бета-галактозидазы, лактазы, ЕС 3.2.1.23), ферменты класса гидролаз, могут быть извлечены из разных источников: в базах данных упоминаются 420 организмов, способных вырабатывать эти ферменты [30]. При анализе патентов выявлено более 20 разных родов дрожжей-продуцентов, представители которых применялись в процессах получения ГОС [31]. Однако для промышленного производства бета-галактозидаз используют только несколько видов микроорганизмов-продуцентов, признанных безопасными, в т. ч. принадлежащих роду *Kluyveromyces* [14].

Kluyveromyces генетически близкородственны традиционным (пекарским) дрожжам *S. cerevisiae* и похожи

на них эллипсоидной формой клеток, основным способом размножения – почкованием, способностью к споруляции и гибридизации в неблагоприятных условиях. Тем не менее представители рода *Kluyveromyces* в ходе эволюции приобрели гены LAC12 и LAC4, которые кодируют пермеазу для транспортировки молекул лактозы в клетку и бета-галактозидазу для ее расщепления на глюкозу и галактозу. Это позволило им освоить новый питательный субстрат – молочное сырье. *Kluyveromyces* также отличаются более высокой устойчивостью к изменению температуры и pH, скоростью роста и накопления биомассы на многих недорогих субстратах в аэробных условиях без индукции спиртов (т. к. дрожжи *Crabtree* – отрицательные), повышенными уровнями секреции белка. Генетические инструменты регулирования экспрессии у этих дрожжей изучены, что повышает их ценность в области синтетической биологии и биотехнологии. Впрочем, и без генетических модификаций *Kluyveromyces* обладают высоким промышленным потенциалом в производстве разных белков (включая ферменты), ароматизаторов, а также в качестве пробиотиков [32]. Наиболее известные виды этого рода, *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus*, имеют международный недавно вновь подтвержденный статус безопасности QPS, рекомендуемый биологические агенты к добавлению в пищу или корма [33].

K. lactis (*Candida sphaerica*) давно применяют в качестве продуцента бета-галактозидаз, производимых в значительных объемах и востребованных на рынке для эффективного гидролиза лактозы в молочных продуктах, а также для получения олигосахаридов-пробиотиков. В последние десятилетия *K. lactis* активно использовали в качестве модельного организма для экспрессии рекомбинантных белков (около 100), исследования заболеваний и основных клеточных механизмов [34]. Другой вид, *K. marxianus* (*Kluyveromyces fragilis*, *Candida kefir*), обладает уникальной для дрожжей термотолерантностью с верхней границей 50 °C и самой высокой скоростью роста среди эукариотов. Это свойство, а также способность переключаться в анаэробных условиях на спиртовое брожение используют в производстве этанола. Благодаря международному статусу безопасности *K. marxianus* применяют для получения различных пищевых ферментов (бета-галактозидаза, бета-глюкозидаза, инулиназа и полигалактуроназа), используют как пекарские дрожжи и антихолестеринемическое средство. Среди штаммов дрожжей этого вида отмечено значительное фенотипическое и генотипическое разнообразие, что необходимо учитывать при их использовании в биотехнологии [35].

Характеристика лактазы *K. lactis*. Бета-галактозидазы дрожжей являются ферментами внутриклеточной локализации. Структура и механизмы действия лактазы *K. lactis* изучены лучше, чем ферменты других продуцентов [14]. Бета-галактозидаза штамма

K. lactis ATCC 8585 (BGAL_KLULA) относится к семейству GH2 и представляет собой гомотетрамер, каждый из мономеров которого имеет молекулярную массу 119 кДа и состоит из 1025 аминокислот. Тетрамер может диссоциировать на димеры, в растворе обе формы находятся в равновесии. Полная диссоциация на мономеры приводит к потере активности фермента. Каждый мономер включает 5 доменов, причем структура 2 и 3 доменов отличается от структуры бактериальных ферментов семейства GH2 (например лактазы *Escherichia coli*). Это может быть связано со специфичностью бета-галактозидазы *K. lactis* и ее способностью к олигомеризации. Два активных центра связывания с галактозным остатком лактозы обнаружены в узком канале внутри каждого димера [36]. Общая структура бета-галактозидазы *K. lactis* и сайт связывания, а также катионы магния и натрия, которые считаются индукторами фермента, показаны на рисунке 3.

Данные о свойствах лактаз *K. lactis* отличаются в разных публикациях и сертификатах производителей ферментных препаратов, что может быть связано с применением разных штаммов и способов производства [5, 10, 14, 22, 24]. Оптимальными условиями действия бета-галактозидазы из *K. lactis* обычно считается температура 30–40 °С и pH 6–7, активность частично сохраняется в диапазоне 25–45 °С и при pH = 5,5–8,5 [30]. Лактаза *K. marxianus* находится в растворе в основном в димерной форме, для нее характерна более высокая устойчивость к температуре (оптимум – 37 °С; минимум – 22 °С; максимум – 50 °С) и pH (оптимум – 6,8; минимум – 3,5; максимум – 10) [38].

Бета-галактозидазы из *Kluyveromyces* широко используют в молочной промышленности для гидролиза лактозы с целью получения низко- и безлактозных продуктов, необходимых людям с лактазной недоста-

точностью, а также для частичной замены сахарозы и предотвращения кристаллизации в мороженом и сгущенном молоке [10, 14]. Одновременно с гидролизом лактозы может происходить трансгалактозилирование с образованием ГОС. Реакция считается кинетически контролируемой, ее основные механизмы описаны в разделе «Основные процессы и механизмы получения галактоолигосахаридов». При этом лактоза служит как донором, так и акцептором галактозы, такие же роли может играть любой из образовавшихся олигосахаридов.

Концентрация донора галактозила как лимитирующего субстрата влияет на баланс между гидролитической и трансгалактозилирующей активностью фермента. Лактоза и *d*-галактоза могут стабилизировать общую структуру бета-галактозидазы путем связывания субстрата с его активным участком [14, 22]. Эксперименты с мечеными молекулами галактозы и глюкозы показали, что в реакциях трансгалактозилирования оба моносахарида действуют как субстраты-акцепторы. Это может быть связано с тем, что изомеры лактозы с (1→2), (1→3) и (1→6) связями образуются в результате акцепторных реакций со свободной глюкозой, а не путем ее перегруппировки в активном центре [39]. Селективность (аффинитет) бета-галактозидазы к донору и акцептору галактозы, соотношение скоростей гидролиза и синтеза, состав и структура получаемых углеводов зависят от свойств фермента и условий проведения реакций [1, 12, 13].

Кинетика реакций с лактазами *K. lactis* и условия получения максимальных выходов галактоолигосахаридов. Кинетика реакций, протекающих в растворах лактозы в присутствии бета-галактозидаз из *K. lactis*, показана на рисунке 4 (по данным собственных экспериментов, согласуются с результатами других

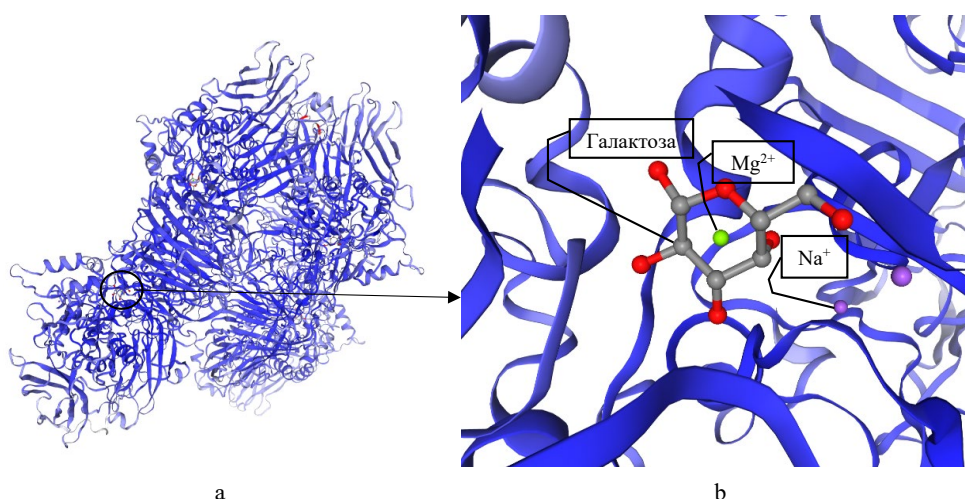


Рисунок 3. Структура бета-галактозидазы из *Kluyveromyces lactis* в комплексе с галактозой: а – общий вид; б – увеличенное изображение сайта связывания галактозы [37]

Figure 3. Structure of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in complex with galactose: а – general view, б – galactose binding site enlarged [37]

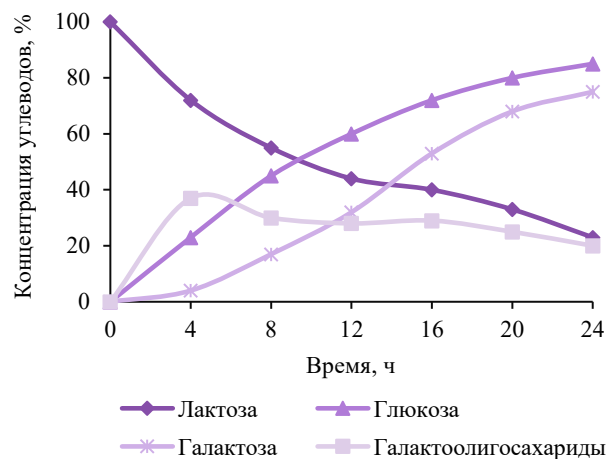


Рисунок 4. Кинетика изменения концентрации углеводов в 30 % растворе молочного сахара с ферментным препаратом HA-Lactase при 40 °C и pH 6,5

Figure 4. Carbohydrate concentrations in 30% milk-sugar solution with HA-Lactase at 40°C and pH 6.5

исследований). Трансгалактозилирование, как правило, наиболее активно протекает на первом этапе реакции, и чем больше активность фермента, тем быстрее растет концентрация ГОС. В дальнейшем образовавшаяся глюкоза начинает ингибировать трансферазную активность лактазы, и скорость гидролиза ГОС начинает превышать скорость их синтеза. Падение концентрации ГОС более выражено в чистых растворах лактозы при высоких температурах, что требует точного определения оптимальных условий выхода ГОС. Снижение концентрации лактозы обусловлено реакциями гидролиза и трансгалактозилирования и наблюдается на протяжении всей реакции, так же как и рост концентрации глюкозы и галактозы. Для глюкозы он более выражен, т. к. галактоза переносится галактозилферментным комплексом к акцепторам и участвует в образовании ГОС с разной степенью полимеризации [13, 40, 41].

В ряде работ проводили сравнение результатов синтеза ГОС с использованием бета-галактозидаз разных видов микроорганизмов. Данные об условиях максимального выхода ГОС с ферментами *K. lactis* и других видов продуцентов обобщены в таблице 1.

Лактазы *K. lactis* позволили достичь выхода ГОС 28–29 % в концентрированных 40 % растворах лактозы, этот показатель был стабильным для ферментов *K. lactis* разных производителей. Более высокий выход ГОС (48 %) получен в экспериментах с рекомбинантной бета-галактозидазой *Bacillus circulans* и 50 % растворами лактозы [39], при использовании немодифицированных ферментов и 40 % растворов лактозы он был кратковременным и на 15–19 % ниже [22, 43]. Выход ГОС с бета-галактозидазами *K. lactis* близок к результатам работы с ферментом *Aspergillus oryzae* в исследованиях [22, 44] и значительно выше, чем

с *A. oryzae*, в других публикациях [39, 41]. При этом продуктивность и степень конверсии лактозы в опытах с *K. lactis* были значительно выше, чем с *B. circulans* и *A. oryzae* [22, 42, 44].

Бактериальные лактазы показали низкую трансгалактозилирующую активность: выход ГОС был в 1,9 раза меньше при использовании фермента из бифидобактерий, из кишечной палочки – в 6,3 раза меньше, чем из *K. lactis* [44, 46]. Более низкая концентрация ГОС в опытах с бета-галактозидазами *K. lactis* чем при использовании *B. circulans* и *A. oryzae* [43] может быть обусловлена повышенным уровнем pH (7,5). Так, Reina-Posso and Gonzales-Zubiate [35] установили, что изменение pH от 6,5 до 7,5 приводило к существенному (в 1,8 раза) снижению гидролитической активности фермента *K. lactis* (Lactozym Pure 6500L, Novozymes A/S, Дания), а также к уменьшению концентрации три- и тетрасахаридов более чем в два раза. В остальных исследованиях максимальный выход ГОС был получен при pH 6,5–7 [25, 43, 45], а самое высокое значение этого показателя (41 %) – при pH 6 [41]. При синтезе ГОС были использованы широкие пределы варьирования температур – 35–50 °C (60 °C для иммобилизованной формы) и pH = 4,4–7,5, выходящие за рамки оптимальных значений для лактаз *K. lactis*.

Большинство опубликованных исследований о биосинтезе ГОС связаны с использованием бета-галактозидазы *K. lactis*. Информация о применении других видов этого рода и разных штаммов ограничена. В обзоре [13] были обобщены результаты работ по получению ГОС, выполненных до 2010 г. Неочищенные (crude) ферменты *K. marxianus* катализируют реакции трансгалактозилирования с выходом ГОС (45 % – в растворах лактозы и 24 % – в сыворотке), сопоставимым с лактазами *K. lactis* при аналогичных условиях [13]. Позже неочищенные клеточные экстракты 13 штаммов *K. lactis* и 2 штаммов *K. marxianus*, выделенных из кустарных сыров на основе овечьего и козьего молока, были протестированы для получения ГОС из лактозы (250 г/л при pH 6,5 и 6,0 ед./мл активности β-галактозидаз при 50 °C). Экстракты были получены путем механического разрушения (истирания) клеток продуцентов. Все исследованные препараты позволили синтезировать отличные от лактозы дисахариды, в т. ч. 6-галактобиозу, и трисахариды со структурой 3'-, 4'- и 6'-галактозил-лактозы. Прямую зависимость между гидролитической и трансгалактозилирующей активностью ферментов не наблюдали. Самые высокие выходы ГОС через 4 ч реакции были получены в экспериментах со штаммами *K. marxianus* O₂ и O₃ (35 и 42 % соответственно). Трансгалактозилирование с ферментами последнего штамма сопровождалось высокой степенью распада лактозы (80 %) и было более стабильным, чем при использовании других продуцентов, где концентрация ГОС резко снижалась после достижения максимума на уровне 26–32 % [47]. Известно также применение *K. marxianus* в виде целых

Таблица 1. Условия получения максимальных выходов ГОС ($Y_{\max}$, %) с использованием свободных бета-галактозидаз разных продуцентов и растворов лактозыTable 1. Obtaining maximal yields of galacto-oligosaccharides ($Y_{\max}$, %) using free beta-galactosidases from different producers and lactose solutions

Продуцент бета-галактозидазы	Ферментный препарат, производитель	$C_{\text{л}}$, %	t , °C	pH	Время, ч	$A_{\text{ф}}$, ед./г	$B_{\text{ГОС}}$, %	$K_{\text{л}}$, %	Ссылка
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Biolactasa-NL, Biocon, Испания	40	40	7,0	–	10,00	29,0	–	[22]
	Enzeco Lactase NL, EDC, США	40	40	7,0	–	10,00	29,0	–	
	Maxilact L200, DSM, Нидерланды	40	40	7,0	–	10,00	29,0	–	
	Lactozym Pure 2600L, Novozymes, Бразилия	40	40	7,0	–	10,00	28,0	–	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzeco Fungal Lactase, EDC, США	40	40	4,5	–	10,00	29,0	–	–
<i>Bacillus circulans</i>	Biocon NTL 3000, Biocon, Испания	40	40	6,0	–	10,00	39,0	–	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Opti-lactase LX2, optiferm GmbH, Германия	20	45	6,5	0,7	50,00	28,7	89	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Opti-lactase A50, optiferm GmbH, Германия	20	55	4,5	3,0	50,00	24,3	51	[39]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactozym 2600L	30	40	7,0	6,0	3,75	34,9	92	
<i>Aspergillus oryzae</i>	–	30	45	4,5	8,0	3,75	19,5	70	
<i>Bacillus circulans</i>	rBgaD-D*	50	60	6,0	8,0	3,75	48,3	88	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactozym 3000 L HP-G, Novozymes A/S, Дания	40	40	7,5	7,0	12,00	9,0	51	[43]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Extrakt Chemie, Германия	40	40	4,5	7,0	12,00	21,0	41	
<i>Bacillus circulans</i>	Biolactasa-NTL, Испания	40	40	7,0	5,0	12,00	41,0	49	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxilact LGi 5000, DSM Food Specialities Нидерланды	40	40	6,5	1,5	10,00	28,2	78	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Maxilact A4 MG*, DSM Food Specialities B. V., Нидерланды	40	40	4,5	1,3	20,00	27,5	56	[44]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Saphera 2600 L*, Novozymes A/S	40	40	6,5	1,5	10,00	15,0	75	
	NOLA Fit 5500,	40	40	6,5	1,3	10,00	15,0	71	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	HA-Lactase 5200, Chr. Hansen, Колумбия	40	42	6,0	3,0	1,90	41,0	70	[41]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzeco Fungal Lactase, EDC, США	40	42	4,5	5,0	0,20	35,0	60	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	HA-Lactase 5200, Chr. Hansen, Колумбия	16	7	6,7	4,0	2,50	8,8	90	[45]
<i>Bacillus licheniformis</i>	NOLA Fit 5500, Chr. Hansen, Индия	16	7	6,7	4,0	2,50	8,2	60	

Примечание: $C_{\text{л}}$ – концентрация лактозы (здесь и далее – %, вес/объем); t – температура; $A_{\text{ф}}$ – активность фермента; $B_{\text{ГОС}}$ – максимальный выход ГОС, в % от исходной лактозы; $K_{\text{л}}$ – конверсия лактозы (гидролиз + трансгалактозилирование, в % от исходной лактозы); * – рекомбинантный фермент.

Note: $C_{\text{л}}$ – lactose concentration (% weight/volume); t – temperature; $A_{\text{ф}}$ – enzyme activity; $B_{\text{ГОС}}$ – maximal yield of galacto-oligosaccharides, % to initial lactose; $K_{\text{л}}$ – lactose conversion (hydrolysis + transgalactosylation, % to initial lactose); * – recombinant enzyme.

клеток и в иммобилизованной форме [48–51], которое будет рассмотрено в разделе «Формы применения бета-галактозидаз».

Состав и структура галактоолигосахаридов, полученных с лактазами *K. lactis* и других продуцентов. Состав ГОС также зависит от источника бета-галактозидазы (рис. 5). Хотя во всех трех смесях более половины от общего содержания ГОС занимают трисахариды, в случае применения ферментов *A. oryzae* эта

фракция доминирует (более 90 %). Отличительной особенностью продуктов, полученных с использованием бета-галактозидаз *B. circulans*, является заметно более высокая концентрация тетрасахаридов (около 30 %) и появление в составе олигосахаридов со степенью полимеризации 5. Для ГОС, синтезированных с участием лактазы *K. lactis*, характерна высокая доля дисахаридов с формулами $[\text{Gal-}\beta(1\rightarrow6)\text{-Glc}]$ (аллолактоза), $[\text{Gal-}\beta(1\rightarrow6)\text{-Gal}]$ (галактобиоза), $[\text{Gal-}\beta(1\rightarrow4)\text{-Gal}]$



Рисунок 5. Состав ГОС в образцах, полученных с использованием бета-галактозидаз разных продуцентов (средние значения рассчитаны по [43, 47, 53, 53])

Figure 5. Compositions of galacto-oligosaccharides in samples obtained using beta-galactosidases from different producers, mean values as in [43, 47, 53, 53]

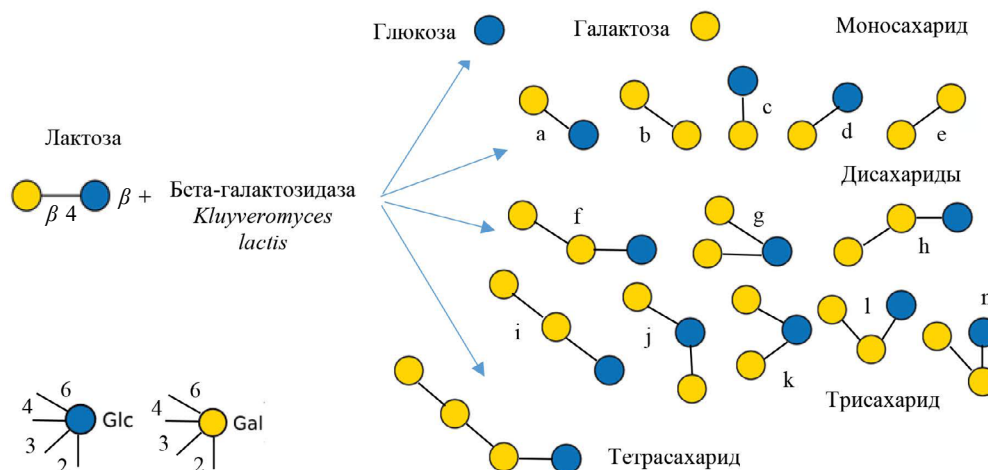


Рисунок 6. Возможные продукты биотрансформации лактозы в присутствии бета-галактозидазы *Kluyveromyces lactis* (обобщение данных из [4, 23–25, 39, 52, 53])

Figure 6. Possible products of lactose biotransformation with *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase, summary of data from [4, 23–25, 39, 52, 53]

или [Gal- β (1 $\rightarrow$ 3)-Gal], которые отличаются от лактозы [Gal- β (1 $\rightarrow$ 4)-Glc]. Если в начале 20 в. пребиотический эффект ГОС объясняли в основном три- и тетрасахаридами [13], то проведенные в последние годы исследования показали, что такие дисахариды могут проявлять пребиотические свойства, аналогичные более сложным олигосахаридам [3].

Не только дисахаридная, но и более сложные фракции ГОС могут содержать разные по мономерному составу и связям углеводы. Возможные структуры углеводов в смесях, полученных с использованием бета-галактозидазы *K. lactis*, представлены на рисунке 6.

Группа дисахаридов содержит 5 различных углеводов, два из которых состоят только из остатков галактозы, в основном соединенных β -(1 $\rightarrow$ 6), реже с β -(1 $\rightarrow$ 3) связями (структуры b и e соответственно), а три – из галактозы и глюкозы с β -(1 $\rightarrow$ 6), β -(1 $\rightarrow$ 3) и β -(1 $\rightarrow$ 2) связями (a, c, d). Среди трисахаридов, синтезированных

ных лактазой *K. lactis*, обнаружено 8 разных структур, содержащих 2 остатка галактозы, соединенных между собой преимущественно β -(1 $\rightarrow$ 6) связями (f, i, l, m), а с глюкозой – β -(1 $\rightarrow$ 4) (f, g, h) и β -(1 $\rightarrow$ 6) связями (g, i, j, k). Тетрасахарид, чаще всего присутствующий в смеси, имеет только β -(1 $\rightarrow$ 6) связи между тремя остатками галактозы и β -(1 $\rightarrow$ 4) связь с глюкозой. Лактаза одного из штаммов *K. marxianus* при синтезе ГОС давала в основном тетрасахариды [51]. Концентрация ГОС со степенью полимеризации 2 и 4 неуклонно увеличивались с течением времени, а концентрация трисахаридов достигала максимального значения, за которым следовало ее снижение. Такое поведение объясняется обратимостью реакции образования трисахаридов и их участием в образовании тетрасахаридов [41].

Связи β -(1 $\rightarrow$ 6) и β -(1 $\rightarrow$ 4) характерны для ГОС, синтезированных не только благодаря лактазам *K. lactis*, но и другим, полученным из *A. oryzae* или *Bifido-*

bacterium bifidum. Бета-галактозидаза *B. circulans* катализирует формирование β -(1–4) и β -(1–3), а полученная из лактобацилл – β -(1–6) и β -(1–3) связи [2, 22, 23, 39, 52]. Это важно, т. к. тип гликозидных связей и степень полимеризации олигосахаридов влияют на их устойчивость к пищеварительным ферментам. После употребления здоровыми мужчинами 5 г ГОС около 24 % гидролизовалось к моменту достижения проксимального отдела толстой кишки, при этом ГОС со степенью полимеризации ≥ 3 остались в нерасщепленном виде, а степень усвоения дисахаридов зависела от их структуры и была самой высокой для смеси углеводов β -D-гал-(1→2)-D-глю + β -D-гал-(1→3)-D-глю и самой низкой для β -D-гал-(1→4)-D-гал [54]. ГОС с преобладающими связями β (1→6) в 1,9 раза, а с β (1→4) в 1,4 раза хуже переваривались ферментами мембраны щеточной каймы тонкого кишечника, чем углеводы со связями β (1→3) [55]. Фракции со степенью полимеризации 2 и 3 неочищенного препарата ГОС показали более выраженное влияние на сохранение целостности эпителия кишечника, чем очищенный образец [56]. Возможно, это связано с оставшейся лактозой, поскольку смесь ГОС β -(1–4), содержащая этот дисахарид, повышала экспрессию генов, ответственных за синтез слизи бокаловидными клетками кишечника. Смесь без лактозы не оказывала такого действия [57].

Таким образом, бета-галактозидазы дрожжей рода *Kluyveromyces* имеют сложную структуру и могут одновременно катализировать реакции гидролиза и трансгалактозилирования. От соотношения скоростей этих реакций зависит выход и состав ГОС. Более изучены и чаще применяются лактазы *K. lactis*, образованные ими ГОС обычно имеют степень полимеризации 2 и 3. Кроме наиболее широко применяемых свободных очищенных ферментных препаратов, бета-галактозидазы могут также использоваться в виде цельноклеточных ферментов в иммобилизованной форме и совместно с другими ферментами.

Формы применения бета-галактозидаз. Целые клетки как источники ферментов для синтеза галактоолигосахаридов. Как было показано выше, источниками бета-галактозидаз могут быть как целые клетки, так и ферментные препараты разной степени очистки. Лактазы дрожжей являются эндоферментами, поэтому клетки должны быть полностью или частично разрушены с помощью физического, химического или механического воздействия. Многоэтапная очистка от клеточных компонентов и последующее концентрирование приводят к высокой стоимости ферментов. Более дешевым способом извлечения дрожжевых бета-галактозидаз является пермеабиллизация, направленная на частичное разрушение клеточных оболочек. Для этого обычно используют этиловый спирт или другие органические растворители, повреждающие фосфолипидный слой цитоплазматической мембраны. Так как фермент остается в небольшом объеме клетки и защищен ее поверхностными структурами, вероят-

ность его диссоциации и инактивации уменьшается [14]. Более того, поверхность клеточной стенки дрожжей рассматривается как матрица для иммобилизации ферментов, которые могут приобретать повышенную устойчивость к изменениям температуры, pH, органическим растворителям и протеазам [58].

Клетки штамма *K. lactis* СЕСТ 1931 были пермеабиллизированы 50 % этанолом и использованы для синтеза ГОС в сравнении с двумя коммерческими бета-галактозидазами из *K. lactis* (Lactozym 3000 L HP G и Maxilact LGX 5000). Цельноклеточный фермент был более термостабильным при 40 °С и давал при этой температуре максимальный выход ГОС (44 %). Это на 4–8 % выше и значительно быстрее (уже через 6 ч реакции), чем с очищенными ферментами (через 22 ч) при тех же условиях (в 40 % растворах лактозы при pH 6,8 и активности фермента 1,2 ед./мл) [53]. Проницаемость мембран другого штамма, *K. lactis* CICC 1773, была повышена обработкой 30 % этанолом для ускорения массопереноса субстрата и высвобождения олигосахаридных продуктов, после чего клетки использовали для синтеза ГОС. Максимальный выход ГОС (35 %) был получен после внесения пермеабиллизированных клеток в концентрации 18,9 г/л в 40 % растворы лактозы при pH 8 (значение, существенно отличающееся от всех других работ, где оптимум pH находился в пределах 6,5–7) и проведении реакции при 40 °С в течение 1,5 ч [59].

В ряде работ показана эффективность применения дрожжей другого вида, *K. marxianus*, в форме цельноклеточных биокатализаторов для синтеза ГОС [48–51]. Среди 13 исследованных штаммов *K. marxianus*, выделенных из различных молочных продуктов, были отобраны два – *K. marxianus* 904 и t3 (источники – белый сыр и йогурт соответственно, оба продукта из коровьего молока) с повышенной активностью общей конверсии лактозы (гидролиз и трансгалактозилирование, до 98 %) и высоким выходом три- и тетраолигосахаридов. Использование этих штаммов позволило достичь выхода ГОС на уровне 50 и 43 % соответственно после добавления раствора лактозы с концентрацией 40 г/л к пермеабиллизированным толуолом клеткам дрожжей и проведения реакции при pH 7 и 28 °С. Эти же штаммы дали бета-галактозидазы с наиболее высокой гидролитической активностью, хотя третий штамм с такой же активностью, *K. marxianus* 9016, показал выход ГОС почти в 2 раза меньше [48].

Бета-галактозидаза пермеабиллизированных этанолом клеток *K. marxianus* NCIM 3551 имела более высокую трансгалактозилирующую активность, чем у трех других штаммов дрожжей рода *Kluyveromyces*, и самую низкую гидролитическую активность. При использовании этого штамма в виде цельноклеточного биокатализатора для синтеза ГОС был достигнут максимальный выход ГОС (36 %) при конверсии лактозы 80 % и производительности 24 г/л·ч, (при концентрации лактозы 20 % (мас./об.), 40 °С, pH 6,5 и 1,2 ед./мл после 3 ч реакции). Продукты реакции, определенные

с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии, представляли собой в основном три- и тетрасахариды, последние доминировали в смеси [51].

Пермеабелизованные клетки *K. marxianus* NCIM 3551 в свободной форме показали на 16 % более высокую гидролитическую активность бета-галактозидазы и дали выход ГОС почти на 40 % больше, чем иммобилизованные на альгинатной матрице [49]. Полученная с этим же продуцентом смесь, содержащая около 18 % ГОС, 16 % – лактозы и 67 % – моносахаридов, была подвергнута нанофильтрации. Для этого использовали спирально-навитые мембраны из разных материалов – полисульфона, ацетата целлюлозы и полиэфирсульфона. Последний показал наилучшие результаты по очистке смеси ГОС от моно- и дисахаридов. Обработка при 50 °С и давлении 15 бар позволила получить высокую чистоту ГОС (около 89 %). Полученный препарат показал пребиотическую активность *in vitro* [50].

Методы иммобилизации ферментов и их применение в синтезе галактоолигосахаридов. К наиболее известным способам повышения эффективности действия ферментов относится иммобилизация, которая позволяет не только их восстанавливать и многократно использовать, но и повысить стабильность, селективность, расширить диапазон pH и температур проводимых реакций. Способы иммобилизации бета-галактозидаз дрожжей *Kluyveromyces* можно классифицировать по формам применения фермента

и образования связи с ним, носителям и веществам основы (матрицы), а также видам связывающих агентов (рис. 7) [49, 60–67].

Наиболее часто для иммобилизации бета-галактозидазы *K. lactis* применяют ковалентное связывание, активированное глутаральдегидом. Такой метод с использованием полимера полисилоксана-поливинилового спирта в качестве матрицы позволил получить максимальный выход трисахаридов на уровне 2,5 % в 27 % растворе лактозы при pH 7,1 и 40 °С. Дальнейшая оптимизация соотношения объемов реагентов и носителя дала возможность повысить трансгалактизирующую активность фермента и содержание трисахаридов до 4,4 %, а также синтезировать около 1,4 % тетрасахаридов [60].

Так как глутаральдегид не одобрен для применения в пищевых продуктах, в ряде работ он был заменен генипином, сшивающим агентом растительного происхождения [14]. В исследовании [66] генипин использовали как продуцент бета-галактозидазы для синтеза ГОС с целью иммобилизации клеток *K. lactis* CGMCC 2.1494. Фермент в иммобилизованных клетках стал более устойчив к температуре и органическим растворителям по сравнению со свободными клетками. Галактоза из растений под воздействием фермента была полимеризована в ГОС с максимальным выходом на уровне 49 %. Иммобилизованные клетки могли быть использованы многократно: в течение 20 циклов синтеза ГОС активность фермента оставалась выше 70 %.

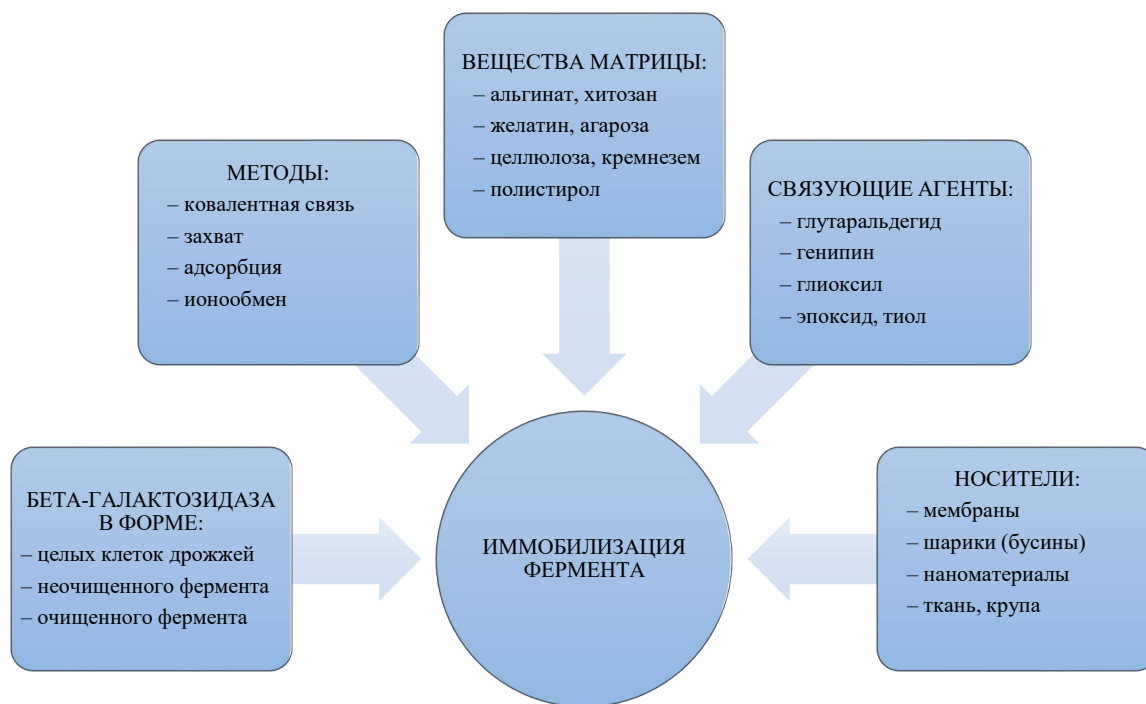


Рисунок 7. Методы и вещества, применяемые для иммобилизации бета-галактозидаз *Kluyveromyces*

Figure 7. Methods and substances used to immobilize *Kluyveromyces* beta-galactosidases

В качестве безопасной основы для иммобилизации ферментов в пищевой промышленности часто применяют альгинаты, получаемые из морских водорослей. Клетки *K. marxianus* NCIM 3551 использовали для непрерывного синтеза ГОС в свободной форме и после иммобилизации альгинатом натрия. Процессы проводили в реакторе с уплотненным слоем, реакцию – в 20 % растворах лактозы. После иммобилизации активность бета-галактозидазы снизилась по сравнению со свободными клетками, но ее термостабильность увеличилась. Более высокие показатели по выходу ГОС (72 г/л) и удельной производительности ГОС (60 г/л·ед.) были получены в периодическом процессе со свободными клетками. С иммобилизованными клетками снижение этих показателей составило 41 %. Повторение реакции в течение 10 циклов позволило достичь почти одинаковой производительности для свободных и иммобилизованных клеток, а использование последних для непрерывного синтеза ГОС в течение 10 дней и оптимизация скорости потока – повысить выход ГОС до 64 г/л [49].

Иммобилизацию бета-галактозидазы *K. lactis* (Maxi-lact LGi 5000, DSM, Нидерланды) на кальциево-альгинатных бусинах, в т. ч. обработанных конкавалином (белком растительного происхождения) в качестве связующего агента, применяли для биоконверсии лактозы в разных видах сырья. Иммобилизованный на альгинате фермент был использован в дальнейших опытах, потому что имел максимальную активность в более широком диапазоне ($\text{pH} = 7,0\text{--}7,5$), чем свободный ($\text{pH}_{\text{опт}} = 6,5$) или в опытах с конкавалином ($\text{pH}_{\text{опт}} = 6,0$). Выход ГОС в 5 % растворах лактозы при 37 °C и $\text{pH} 7,0$ достиг максимума через 2,5 ч и составил 44 % [64]. Трансгалактозилирование шло быстрее в подсырной сыворотке: уже через 1,5 ч реакции выход ГОС в сыворотке был в 1,5 раза больше, чем в растворе лактозы (применение сыворотки в качестве сырья будет рассмотрено в разделе «Особенности получения галакто-олигосахаридов в молоке, сыворотке и пермеатах»).

Проблемой иммобилизации бета-галактозидазы *K. lactis* является необходимость сохранения ее олигомерной структуры, при этом относительно крупный размер фермента требует определенного диаметра пор матрицы, что может снижать производственные характеристики. Альтернативой может быть иммобилизация агрегатов ферментов или непористых наноматериалов [14]. Полистирольные нановолокна с локальной гидрофобностью на поверхности, изготовленные методом электропрядения, были функционализированы для иммобилизации бета-галактозидазы *K. lactis* с помощью метода химического окисления. Это позволило значительно улучшить адсорбцию (до 3100 мг/г нановолокна) и стабильность фермента (до 80 % его исходной активности). Свободная бета-галактозидаза демонстрировала более высокую гидролитическую активность, чем иммобилизованная, при этом последняя проявляла выраженную способность к транс-

лактозилированию: через 60 мин реакции выход ГОС достигал 28 %, что в 3 раза больше, чем в опытах со свободным ферментом [61].

Позже эта группа исследователей с помощью сканирующей электронной микроскопии и флуоресцентного анализа выявила гомогенность иммобилизации, тонкослойную структурную конформацию и биохимические функции этого нанобиокатализатора. Благодаря тому, что он обеспечивал контролируемое время контакта продуктов и субстратов на поверхности нановолокна, был достигнут высокий выход ГОС (41 %) при конверсии лактозы 88 %, когда использовали 30 % растворы лактозы и короткое (около 1 мин) время пребывания в дисковом колоночном реакторе. Такой выход ГОС был в 1,3 раза выше, чем этот показатель при использовании спирального реактора, и в 2 раза выше, чем при использовании периодического процесса с такими же нановолокнами и исходной концентрацией лактозы [62].

В исследовании Chenafa *et al.* [65] подобные полистирольные нановолоконные мембраны были функционализированы оксидом графена и 3-аминопропилтриэтоксисиланом. Такая обработка позволила улучшить адсорбцию фермента и его стабильность при хранении, самую высокую активность наблюдали при 50 °C и $\text{pH} 4,5$. В этих условиях получены более высокие показатели выхода ГОС (72 %) и конверсии лактозы (81 %), чем при использовании свободного фермента.

Характеристики процесса могут быть улучшены путем одновременного проведения синтеза ГОС и селективного удаления продуктов реакции в мембранном биореакторе. При использовании непрерывного процесса ферментации 30 % растворов лактозы бета-галактозидазой Lactozym Pure 6500L (Novozymes A/S, Дания) из *K. lactis* в ультрафильтрационном мембранном биореакторе, сопряженном с системой нанофильтрационного разделения, выход ГОС достигал 33 % с чистой около 57 %. Ren *et al.* [67] получили математические модели, достоверно описывающие изменение соотношения между выходом и чистой олигосахаридов в процессе фильтрации.

Присутствие в растворе высокомолекулярной бета-галактозидазы *K. lactis* с ди- и тетрамерной структурой в сочетании с высокой общей концентрацией углеводов может приводить к изменению характеристик массопереноса [28]. Если ацетат-целлюлозная мембрана полностью пропускала моно- и дисахариды и задерживала 25 % трисахаридов из углеводных растворов, то в присутствии ферментного препарата Lactozym 3000L HP-G (Novo Nordisk A/S, Дания) трисахариды задерживались полностью, а ди- и моносахариды – частично (на 80 и 40 % соответственно). По-видимому, фермент формирует на мембране слой, который выполняет каталитические и селективно задерживающие функции, благодаря чему снижается ингибирующий эффект моносахаридов. При совмещении процессов синтеза и мембранного фракционирования при давлении

20 бар выход ГОС был увеличен более чем в 1,5 раза по сравнению с отдельно проведенной ферментацией в аналогичных условиях (в 15 % растворах лактозы при 40 °С; pH 6,5; активности фермента 10 ед./мл и скорости потока 1,7 м/с) [28].

Иммобилизация была использована в процессах получения ГОС с применением молочного сырья и нескольких ферментов [63, 64]. Такой подход представляет особый интерес, поэтому далее будет рассмотрен подробнее.

Комбинирование ферментов и генетическая модификация бета-галактозидаз для получения галактоолигосахаридов. Так как бета-галактозидазы разных видов и штаммов продуцентов значительно отличаются по свойствам, можно предположить, что их совместное применение дает преимущества в плане ускорения процессов, расширения диапазона условий для проведения трансгалактозилирования и улучшения его результатов. Например, добавление закваски термофильного стрептококка в суспензию *K. marxianus* позволило сократить как время автолиза дрожжей (в 4 раза, за счет молочной кислоты), так и время получения максимального выхода ГОС (в 3 раза, благодаря комбинации ферментов и повышенному содержанию галактозы) при проведении биосинтеза в 15 % растворах лактозы при 52 °С. При последующем увеличении концентрации лактозы до 25 % получен максимальный выход ГОС (42,5 %) после ферментации в течение 12 ч [68].

Одновременный синтез ГОС в присутствии двух ферментов из *K. lactis* (Opti-lactase LX2, optiferm GmbH, Германия) и *A. oryzae* (Maxilact A4, DSM Food Specialties B.V., Нидерланды) при соотношении 1:1 и активности 50 ед./г, pH 6,5 и 45 °С в 20 % растворах лактозы показал такой же максимальный выход ГОС (24,6 %), как и при использовании отдельных ферментов. Последовательное применение ферментных препаратов (сначала из *A. oryzae*, затем из *K. lactis*) привело к увеличению выхода ГОС на 8 %, в основном за счет образования отличных от лактозы дисахаридов. Обратная последовательность внесения этих ферментов дала снижение ди- и трисахаридов, но позволила повысить долю ГОС со степенью полимеризации 4 [69].

Вышеописанные ферментные препараты (раздельно) использовали в экспериментах с дополнительным внесением глюкозооксидазы и каталазы для окисления глюкозы до глюконовой кислоты одновременно с биосинтезом ГОС при похожих условиях реакции, кроме более низкой температуры – 25 °С. Для поддержания стабильного уровня pH и осаждения глюконата кальция применяли 40 % раствор CaCO₃, которого потребовалось в 17,5 раз больше в опытах с ферментом *K. lactis*, чем с *A. oryzae*. Возможно, наличие ионов кальция стало причиной более низкой конверсии (на 37 %) лактозы в трехферментной системе с бета-галактозидазой *K. lactis*, чем в контрольных образцах (без глюкозооксидазы и каталазы) через 24 ч ферментации. Опытные

образцы отличались также более низким содержанием дисахаридов и полным отсутствием глюкозы, что приводило к снижению калорийности полученной смеси, но имели такое же содержание ГОС (около 22 %), что и контрольные образцы [70].

Различные комбинации коммерческих бета-галактозидаз из *K. lactis*, *A. oryzae* и *B. bifidum* (названия препаратов, условия и результаты синтеза ГОС при раздельном использовании приведены в табл. 1, источник [44]) применяли для получения ГОС в 40 % растворах лактозы при 40 °С. При последовательном применении ферментов из *K. lactis* (активность 10 ед./мл; pH 6,5; время реакции – 90 мин и последующая инактивация) и *B. bifidum* (при такой же активности и pH, 240 мин) максимальный выход ГОС (28,8 %) был близок к полученному в опытах с первым ферментом и почти в 2 раза выше, чем в опытах со вторым. В составе ГОС доминировали дисахариды 6-галактобиоза, аллолактоза и трисахарид 6-галактозиллактоза. При этом существенно повысилась степень конверсии лактозы – на 13 % по сравнению с первым ферментом и на 20 % по сравнению со вторым, остаточное содержание лактозы составило около 5 %. Самая высокая концентрация ГОС (139 г/л) была получена при последовательном применении бета-галактозидаз *A. oryzae* (активность 20 ед./мл; pH 4,5; 75 мин) и *K. lactis* (активность 10 ед./мл; pH 6,5; 255 мин), что превысило концентрацию ГОС, полученную в опытах с отдельными ферментами на 19 и 37 % соответственно. Основным компонентом ГОС был трисахарид 6-галактозиллактоза. Остальные сочетания ферментов не привели к существенному увеличению выхода ГОС, но в 11 из 13 примененных комбинаций было обнаружено значительное повышение конверсии лактозы по сравнению с отдельными ферментами [44].

Препараты бета-галактозидаз из *K. lactis* и *A. oryzae* применяли не только раздельно (названия препаратов, условия и результаты синтеза ГОС при раздельном использовании приведены в табл. 1, источник [41]), но и совместно в соотношении 1:1. Сочетание ферментов дало более высокий выход ГОС (около 43 % через 3 ч), чем их отдельное применение (41 % через 3 ч и 35 % через 5 ч из *K. lactis* и *A. oryzae* соответственно) в 40 % растворах лактозы при 42 °С. Основными компонентами всех трех смесей были трисахариды (около 20 %), однако в опытах с ферментами из *A. oryzae* и сочетанием ферментов доля тетрасахаридов была в 2 раза больше (около 10 %), чем из *K. lactis*. Полученные авторами кинетические модели более точно описывали процессы трансгалактозилирования в растворах лактозы с отдельными ферментами (достоверность $R = 0,99$), чем с их комбинированием ($R = 0,98$) [41].

Для удаления глюкозы из смеси ГОС, полученной с использованием НА-Lactase 5200 (Chr. Hansen, Колумбия) из *K. lactis* и 40 % растворов лактозы, было предложено дополнительное внесение глюкозооксидазы

Gluzyme из *A. oryzae*, катализирующей окисление глюкозы до глюконовой кислоты. Кроме того, был оценен эффект ультразвука (при 20 кГц и 23 Вт/см²) на результаты ферментации. Одновременное внесение бета-галактозидазы и глюкозооксидазы привело к снижению скорости трансгалактозилирования, а последовательное их применение позволило предотвратить распад ГОС. Самые высокие выходы ГОС (49 %) и глюконовой кислоты (28 %) получены в опытах с последовательным применением ферментов и обработкой ультразвуком через 2 ч реакции. Ультразвуковая обработка не повлияла на бета-галактозидазу, но привела к увеличению активности глюкооксидазы [71].

Методы геной инженерии могут быть использованы для понимания роли аминокислотных остатков в активном центре бета-галактозидаз и механизмов специфичности их действия при синтезе ГОС [1]. Целью исследования [72] было усиление конститутивной экспрессии бета-галактозидазы для улучшения реакции трансгалактозилирования. Для этого дикий штамм *K. lactis* GG799 подвергли мутации путем применения подхода, основанного на нокауте генов пути Лелуара, связанного с метаболизмом галактозы. В результате были получены мутанты gal1 – со сниженной активностью киназы, gal7 – со сниженной активностью трансферазы и штамм с двойным нокаутом – gal1 и gal7. Полученные из них бета-галактозидазы показали более высокую гидролитическую активность (8, 9 и 11 ед./мл соответственно), чем дикий штамм (7 ед./мл), а также дали в 2,0; 2,7 и 3,5 раза соответственно более высокий выход ГОС (по сравнению с ферментом дикого штамма (6,3 %), в 25 % растворах лактозы). Авторы предположили, что экспрессия бета-галактозидазы зависит от внутриклеточной концентрации галактозы как индуктора во время ранней стационарной фазы.

Хотя генетические модификации могут приводить к желательным изменениям свойств ферментов, ГМО вызывают опасения в силу своей недостаточной изученности и потенциальной опасности для здоровья человека. В качестве альтернативы этим методам можно рассматривать гибридизацию дрожжей, которая происходит естественным образом в природе. Гибридизация штаммов *K. lactis*, которые содержат различные локусы LAC, позволила получить гибриды с повышенной интенсивностью сбраживания лактозы [16, 17]. Подобные работы можно проводить и с близкородственным видом, *K. marxianus*, генетика которого хорошо изучена [15, 35]. Так как гидролитическая активность связана с трансгалактозилирующей, можно предположить, что бета-галактозидазы некоторых гибридных штаммов могут давать более высокие выходы ГОС. Это предположение требует дополнительных исследований.

Особенности получения галактоолигосахаридов в молоке, сыворотке и пермеатах. В последнее десятилетие для получения ГОС все чаще используют разные виды молочного сырья, от молока и сыворотки

до пермеатов, получаемых баромембранными методами. Прямой синтез ГОС в таком сырье без дальнейших операций очистки дает возможность получать новые недорогие молочные продукты и добавки, обогащенные пребиотиками [20]. ГОС могут быть синтезированы в процессе гидролиза лактозы при получении молочных продуктов для людей с непереносимостью этого углевода. В промышленном производстве безлактозных продуктов чаще всего применяют бета-галактозидазы *K. lactis* благодаря их доказанной безопасности, высокой гидролитической активности и тому, что молочные среды являются их обычной средой обитания [19].

Данные о примененных ферментах *K. lactis* и других продуцентах, если они использовались в тех же работах для сравнения, максимальных выходах ГОС и условиях их получения в молочном сырье приведены в таблице 2.

Биосинтез ГОС в обезжиренном молоке зависел от источника фермента и температуры. При использовании лактазы из *K. lactis* выход ГОС (около 15 %) был в 1,5 раза больше при 40 °С, чем при 4 °С, и в 3,6 раза больше, чем с ферментом из *A. oryzae* в тех же условиях. При 4 °С все бета-галактозидазы сохраняли свою гидролитическую и трансгликозилирующую активность, хотя реакции протекали медленнее, чем при 40 °С. ГОС, полученные с лактазой из *K. lactis*, содержали 6-галактобиозу, аллолактозу и 6'-О-β-галактозил-лактозу. С этим ферментом была достигнута самая высокая степень конверсии лактозы, при обеих температурах этот показатель более чем в 2 раза превышал значения, полученные с бета-галактозидазами из *A. oryzae* и *B. circulans* [18].

Сгущение обезжиренного молока не привело к существенному повышению выхода ГОС по сравнению с натуральным, но даже при 7 °С конверсия лактозы достигала 95 % [45]. В козьем молоке при использовании другого фермента из *K. lactis* были получены низкие значения выходов ГОС и конверсии лактозы (6,2 и 13,0 % соответственно), и если концентрацию ГОС удалось немного увеличить в молочном пермеате и смеси молока с пермеатом, то конверсия лактозы осталась на том же низком уровне. Трансгалактозилирование в этих видах сырья протекало лучше при 37 °С, чем при 40 и 43 °С. Полученные смеси с пребиотиками использовали для получения кисломолочного продукта смешанного брожения (кефир), при этом сквашивание в них проходило быстрее, чем в молоке [73]. Добавление в восстановленное обезжиренное молоко сахара и / или кукурузного сиропа и разных бета-галактозидаз из молочнокислых бактерий и *K. lactis* позволило синтезировать смесь галактоолигосахаридов, пока неидентифицированных, но способных стимулировать анаэробный рост *Bifidobacterium breve* [76].

В сыворотке реакция трансгалактозилирования протекала активнее, чем в молоке. Ферменты из *K. lactis* дали более высокие выходы ГОС (около 30 %) и конверсию лактозы (около 90 %), чем лактазы из *A. oryzae*

Таблица 2. Условия получения максимальных выходов ГОС ($Y_{\max}$, %) с использованием бета-галактозидаз разных продуцентов и молочного сырьяTable 2. Conditions for obtaining maximal yields of galacto-oligosaccharides ($Y_{\max}$, %) using beta-galactosidases from different producers and dairy raw materials

Продуцент лактазы	Ферментный препарат, производитель	Вид сырья	C _л , %	t, °C	pH	Время, ч	A _ф , Ед/г	B _{ГОС} , %	K _л , %	Ссылка
Молоко										
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactozym Pure 6500 L, Novozymes A/S, Дания	обезжиренное молоко	4,6	4,0	6,7	5,0	29,0	10,4	94	[18]
			4,6	40,0	6,7	1,0	29,0	15,2	95	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Lactase F, Amano, Япония		4,6	4,0	6,7	1,5	2,0	9,1	41	
			4,6	40,0	6,7	> 78,0	2,0	4,2	43	
<i>Bacillus circulans</i>	Biolactase NTL-CONC, Biocon, Испания		4,6	4,0	6,7	2,5	13,0	17,6	44	
			4,6	40,0	6,7	0,75	13,0	16,5	38	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	HA-Lactase 5200, Chr. Hansen, Колумбия	сгущенное обезжиренное молоко	16,0	7,0	6,7	4,0	9,5	12,0	95	[45]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	GODO-YNL2, Danisco, Дания	козье молоко	4,1	37,0	–	0,3	5,0	6,2	13	[73]
		МФ+УФ- пермеат	4,3	37,0	–	0,5	5,0	8,5	13	
		смесь козьего молока и его МФ+УФ- пермеата 60:40	4,2	37,0	–	0,3	5,0	6,9	13	
Сыворотка										
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxilact LGi 5000, DSM, Нидерланды	подсырная сыворотка	4,3	37,0	7,0	3,0	5,0*	63,1	–	[64]
		подсырная сыворотка + лактоза	40,0	46,0	7,0	3,0	5,0*	17,7	61	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Opti-lactase LX2, optiferm GmbH, Германия	сладкая сыворотка	20,0	45,0	6,5	2,0	50,0	32,6	88	[42]
		кислая сыворотка	20,0	45,0	6,5	3,5	50,0	33,5	89	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Opti-lactase A50, optiferm GmbH, Германия	сладкая сыворотка	20,0	55,0	4,5	3,0	50,0	24,9	54	
		кислая сыворотка	20,0	55,0	4,5	3,0	50,0	24,5	55	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Kerry Group plc, Ирландия	йогуртная сыворотка	3,1	35,0	7,2	1,5	0,9	23,7	76	[74]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma-Aldrich, США		20,0	45,0	4,5	7,0	20,0	23,4	52	
<i>Thermo- thielavioides terrestris</i>	Получен и очищен авторами статьи		20,0	50,0	4,0	7,0	40,0	25,7	49	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Kerry Group plc, Ирландия	подсырная сыворотка	15,0	35,0	7,2	5,0	0,9	21,7	96	[75]
		йогуртная сыворотка	3,1	35,0	7,2	1,5	4,2	23,7	76	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma-Aldrich, США	подсырная сыворотка	15,0	45,0	4,5	1,0	13,0	17,9	36	
		йогуртная сыворотка	15,0	45,0	4,5	10,0	6,7	14,9	31	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	HA-Lactase 5200, Chr. Hansen, Колумбия	подсырная сыворотка	40,0	42,0	6,0	1,0	1,9	30,0	75	[41]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzeco Fungal Lactase, EDC, США		40,0	42,0	4,5	5,0	0,9	35,0	65	

Продолжение таблицы 2

Продуцент лактазы	Ферментный препарат, производитель	Вид сырья	C _л , %	t, °C	pH	Время, ч	A _ф , Ед/г	B _{ГОС} , %	K _л , %	Ссылка
Пермеат										
<i>Kluyveromyces lactis</i>	HA-Lactase 5200, Chr. Hansen, Колумбия	пермеат подсырной сыворотки	40,0	42,0	6,0	2,0	1,9	45,0	92	[41]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzeco Fungal Lactase, EDC, США		40,0	42,0	4,5	5,0	0,9	47,0	62	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactozyme 2600 L, Novozymes	пермеат	30,0	35,0	7,0	2,0	50,0	25,0	89	[46]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Merck, Германия		30,0	35,0	7,0	8,0	50,0	15,0	41	
<i>Escherichia coli</i>	Worthington Biochemical Corp., США		30,0	35,0	7,0	12,0	50,0	4,0	39	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	HaLactase 5200, Chr. Hansen, Дания	пермеат сладкой сыворотки	20,5	42,5	6,2	4,0	13,0	23,0	98	[62]
		пермеат кислой сыворотки	18,0	42,5	4,5	4,0	13,2	18,0	94	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	GODO-YNL2, Danisco, Дания	пермеат сладкой сыворотки	20,5	42,5	6,2	4,0	12,5	32,0	86	
		пермеат кислой сыворотки	18,0	42,5	4,5	4,0	13,0	28,0	80	
<i>Bacillus licheniformis</i>	NOLA Fit 5500, Chr. Hansen, Дания	пермеат сладкой сыворотки	20,5	42,5	6,2	4,0	13,8	13,0	78	
		пермеат кислой сыворотки	18,0	42,5	4,5	4,0	14,0	9,0	80	

Примечание: C_л – концентрация лактозы (здесь и далее – %, вес/объем), T – температура, A_ф – активность фермента, B_{ГОС} – максимальный выход ГОС, % от исходной лактозы, K_л – конверсия лактозы (гидролиз + трансгалактозилирование), * – иммобилизация на кальциевых альгинатных бусинах, МФ – микрофльтрация, УФ – ультрафильтрация.

Note: C_л – lactose concentration (% weight/volume), T – temperature, A_ф – enzyme activity, B_{ГОС} – maximal yield of galacto-oligosaccharides, % to initial lactose, K_л – lactose conversion (hydrolysis + transgalactosylation), * – immobilization on calcium-alginate beads, МФ – microfiltration, УФ – ultrafiltration.

(около 25 и 55 % соответственно) в разных видах сыворотки [42]. Более высокая конверсия лактозы с бета-галактозидазой *K. lactis* была получена и в других работах при сравнении результатов реакции с ферментами *A. oryzae*, несмотря на то что выходы ГОС варьировали от 20 до 30 % в зависимости от условий реакции [74, 75].

Применение сыворотки от производства сыра порунго и бета-галактозидазы из *K. lactis*, иммобилизованной на альгинатных шариках, уже через 1,5 ч реакции позволило достичь выхода ГОС 63 %, что в 1,5 раза превышало этот показатель в растворе лактозы, полученного в тех же условиях (pH 7,0; 37 °C). Выше была и производительность периодического процесса по ГОС (13,6 г/ч·л – в сыворотке против 8,2 г/ч·л – в растворе лактозы). После добавления в сыворотку разного количества лактозы и проведения ферментации при различных температурах (37, 46 и 55 °C) максимальные выходы ГОС (около 17 %) были получены при 20 и 40 % концентрации лактозы и 46 °C [64].

Широкий диапазон выходов ГОС, а также отсутствие выраженной зависимости между концентрацией лактозы и выходом ГОС при использовании сыво-

ротки вызывают интерес исследователей. Эти свойства могут быть обусловлены влиянием минеральных веществ, однако данные об этом противоречивы. Fischer and Kleinschmidt [42] установили, что активность бета-галактозидазы из *K. lactis* сильно повышалась в присутствии ионов натрия, калия и аммония, умеренно – в присутствии ионов магния, и не зависела от ионов кальция. В то же время на лактазу из *A. oryzae* все эти ионы не влияли [42]. Другой фермент из *K. lactis* проявлял более высокую гидролитическую активность в присутствии ионов калия, натрия и кальция, но ионы магния, марганца и цинка ингибировали его действие даже при низких концентрациях [74]. Влияние ионов натрия и калия на образование ГОС было изучено с использованием двух моделей (управляемой данными и гибридной), разработанных с помощью искусственной нейронной сети на основе данных экспериментов с лактазой из *K. lactis*, внесенной в растворы лактозы разной концентрации при pH 6,0 и 40 °C. Оптимизация гибридной модели, более точно описывающей кинетику процесса, позволила определить условия получения максимального выхода ГОС после добав-

ления 6 г/л хлорида натрия на уровне около 40 %, что незначительно отличалось от результатов эксперимента по выходу ГОС (43 %), но существенно – по условиям реакции [77].

Возможность получения ГОС в кислой сыворотке с ферментами *K. lactis* показана в ряде работ [42, 74, 75]. Хотя синтез ГОС протекал в этом виде сырья медленнее, чем в 3,8 % растворах лактозы, через 2 ч реакции был получен такой же выход ГОС (около 11 %), причем он был в 2,5 раза выше, чем в сладкой сыворотке. В кислой сыворотке с 20 % концентрацией лактозы выход ГОС достигал 33 % и был аналогичен этому показателю в сладкой сыворотке, что на 4 % превышало выход ГОС в растворах лактозы в таких же условиях. В растворах лактозы наблюдали резкое падение концентрации ГОС после достижения максимальных значений, а в сыворотке этот показатель длительное время оставался стабильным, возможно, благодаря буферным свойствам солей. Состав ГОС был похожим при использовании растворов лактозы и разных видов сыворотки, он включал в основном ди- и трисахариды в соотношении 1:1, при повышении концентрации лактозы до 20 % обнаружены также тетрасахариды [42].

Сыворотка, полученная при концентрировании греческого йогурта, рассматривается как перспективное сырье для производства ГОС. В исследованиях [74, 75] показано, что лактаза из *K. lactis* была эффективнее при трансгалактозилровании в натуральной йогуртной сыворотке, чем два других фермента из *A. oryzae* и *Thermothielavioides terrestris* (максимальный выход ГОС был на уровне 24, 10 и 13 % соответственно). В составе ГОС с применением фермента из *K. lactis* доминировал трисахарид 6-о-β-галактозиллактоза (31,5 %), затем следовали дисахариды 6-галактобиоза (13,6 %) и аллолактоза (7,1 %).

Бета-галактозидаза из *K. lactis* катализировала конверсию лактозы в подсырной сыворотке на уровне 75 % с максимальным выходом ГОС около 30 % через 60 мин реакции, в то время как фермент из *A. oryzae* и сочетание двух ферментов в соотношении 1:1 показали более низкие скорости гидролиза и трансгалактозилрования. Их максимальные выходы ГОС были получены позже, через 5 ч, и составили около 35 %, что ниже, чем в опытах с растворами лактозы или пермеатами [41]. Эти же виды сырья и ферменты были использованы для совершенствования процесса путем добавления глюкозооксидазы и ультразвука для ее активации при окислении глюкозы до глюконовой кислоты. При ферментации подсырной сыворотки самый высокий выход ГОС (около 35 %) был получен через 1 ч реакции, после чего этот показатель медленно снижался, в отличие от пермеата, где снижение было резким. Авторы объясняют это влиянием ионов калия, концентрация которых в 3,7 раза выше в пермеате, чем в сыворотке, что обеспечивает более высокую гидролизную активность лактазы [78].

Влияние ультразвука на ферменты разного происхождения исследовали при синтезе ГОС в концентрированной сыворотке, полученной при микрофильтрации обезжиренного молока. Ультразвуковое воздействие с интенсивностью 11 Вт/см² привело к увеличению активности лактазы из *A. oryzae*, но ускоряло инактивацию фермента из *K. lactis*, что может быть объяснено разной структурой ферментов (мономер – у *A. oryzae* и димер – у *K. lactis*). Увеличение концентрации фермента из *K. lactis* привело к сокращению времени достижения максимального выхода ГОС (около 11 %), за которым последовал их быстрый гидролиз. В опытах с *A. oryzae* ультразвук позволил повысить удельную производительность фермента до значений, полученных с чистой лактозой [79].

Применение сывороточных пермеатов дает возможность замены дорогостоящей лактозы в экономически эффективном производстве ГОС. В исследовании [41] в 40 % пермеате подсырной сыворотки с лактазами *K. lactis* был получен более высокий выход ГОС (45 %), чем в растворах лактозы (41 %) или в сыворотке (30 %) в тех же условиях. При этом конверсия лактозы достигала тоже более высоких значений (92, 70 и 75 % соответственно) [57]. Это может быть связано с присутствием в пермеатах минеральных компонентов, которые активируют бета-галактозидазы. Несмотря на то что в других работах выход ГОС в пермеатах был ниже (18–32 %), фермент из *K. lactis* также был более активным, чем лактазы других продуцентов [46, 63]. Два разных фермента из *K. lactis* показали значительную разницу в синтезе ГОС (максимальный выход ГОС 23 и 32 % при конверсии лактозы 98 и 86 % соответственно), но оба лучше работали в пермеате сладкой сыворотки, чем в кислой, что может быть связано с кислотностью и минеральным составом. В составе ГОС обнаружены в основном олигосахариды со степенью полимеризации 2 и 3 (64 и 54 % от общего содержания ГОС в пермеате сладкой сыворотки; 47 и 43 % в том же виде сырья соответственно). В пермеате кислой сыворотки синтезировали примерно такое же количество дисахаридов (63 и 64 %), но меньше трисахаридов (34 % для обоих ферментов) [63].

Сложный состав сырья и двойственность реакций гидролиз-трансгалактозилрование приводят к проблемам моделирования процессов и прогнозирования их результатов. Для решения этих задач и организации мониторинга производства ГОС в режиме реального времени были разработаны математические модели с использованием метода частичных наименьших квадратов и с многомерным разрешением кривой – чередующимися наименьшими квадратами, построенные на основании данных ИК-Фурье спектроскопии в сочетании с различными хемометрическими подходами. Они позволяют достаточно точно описывать изменение концентрации лактозы, глюкозы, галактозы, а также олигосахаридов с разной степенью полимеризации в разных видах сырья [41].

Еще одна проблема, связанная с особенностями молочного сырья – ограничения традиционных спектрофотометрических методов измерения активности ферментов, которые обычно применяют в прозрачных средах. Для определения активности двух бета-галактозидаз (из *K. lactis* и *A. oryzae*) и кинетики синтеза ГОС в непрозрачных растворах (молоке, сладкой и кислой сыворотках и пермеатах) предложено использовать изотермическую титрационную калориметрию, основанную на измерении скорости нагрева среды ферментации. Компоненты молочного сырья и происхождение ферментов влияют на термодинамику реакции [80].

Результаты трансгалактозилирования в молочном сырье существенно зависят от свойств фермента. Лактазы *K. lactis* в большинстве опубликованных исследований приводят к более высоким значениям конверсии лактозы при максимальном выходе ГОС, чем с другими продуцентами. Это соответствует тенденциям процессов, протекающих в растворах лактозы, однако зависимость выходов ГОС от концентрации лактозы в молочном сырье менее выражена. Это может быть связано с влиянием белковых и минеральных компонентов, которое изучено недостаточно.

Применение дрожжей *Kluveromyces* для повышения чистоты галактоолигосахаридов. Повышение доли ГОС в смеси, получаемой после трансгалактозилирования – сложная и дорогостоящая операция. Биологическая очистка ГОС от лактозы и / или моносахаридов путем их сбраживания различными микроорганизмами считается экономически выгодной альтернативой нанофильтрации, хроматографическим и другим методам [12]. Дрожжи рода *Kluveromyces* оказались эффективным инструментом повышения чистоты ГОС как при отдельном использовании, так и в случае комбинирования с другими микроорганизмами. При этом довольно широко применяют иммобилизацию как метод повышения стабильности фермента и проведения непрерывного процесса [9].

Иммобилизованные клетки *K. lactis* использовали для очистки углеводных смесей, содержащих олигосахариды грудного молока и ГОС. При исходном культивировании клеток отмечено, что *K. lactis* так же хорошо росли на средах с лактозой, как и с глюкозой, даже без дополнительного введения аминокислот. Не обнаружено существенных различий в скорости сбраживания лактозы и образования этилового спирта в селективной, богатой питательными веществами среде, минимальной солевой среде и растворе лактозы в дистиллированной воде, хотя размножение клеток в растворе не наблюдали. Иммобилизация *K. lactis* на гранулах альгината натрия позволила повысить эффективность удаления лактозы из 4 % растворов лактозы в 3,4 раза по сравнению с суспензионной культурой через 12 ч обработки. При повторном использовании иммобилизованных клеток скорость гидролиза лактозы существенно снижалась. Для ускорения

процесса в 2,5 раза была проведена дополнительная активация культуры в селективной среде без аминокислот с 2 % лактозы в течение 4 ч [81].

В качестве носителя для иммобилизации бета-галактозидазы из *Aspergillus* sp. и клеток *K. marxianus* NRRL Y-2415 использовали капсулы поливинилалкоголя в форме линз. Полученная в результате трансгалактозилирования иммобилизованным ферментом смесь ГОС имела низкую чистоту (22,7 %) даже в оптимальных условиях (в 30 % растворе лактозы при 30 °C и pH 4,5 в течение 30 ч). Смесь содержала преимущественно трисахариды, а также тетра- и гексасахариды. Через 20 ч после внесения в смесь клеток *K. marxianus* была утилизирована вся глюкоза, а через 40 ч – все перевариваемые сахара и чистота ГОС достигла 99,7 %, деградация олигосахаридов в процессе очистки не обнаружена. Такая же степень очистки была получена с иммобилизованными клетками через 30 ч, их активность сохранялась после 20 повторных операций, матрица оставалась стабильной [82].

Большой интерес представляют работы, в которых один и тот же штамм дрожжей применен и для трансгалактозилирования, и для очистки ГОС. Предварительную пермеабиллизацию клеток *K. lactis* CICC 1773 проводили в 30 % этаноле, после чего они были добавлены в 30 % растворы лактозы при 35 °C и pH 8,0. Трансгалактозилирование проходило быстрее в растворах с более высокой концентрацией полупроницаемых клеток (1,4–3,7 г/л), но после 1 ч реакции концентрация ГОС резко снижалась. Она росла медленнее, но была более стабильной в растворе с 0,9 г/л клеток, где через 6 ч реакции был получен максимальный выход ГОС (23 %). При уточнении параметров проведения процесса выход был повышен до 35 % через 1,5 ч в 40 % растворах лактозы при 40 °C и внесении 19 г/л пермеабиллизированных клеток. Для увеличения доли ГОС были использованы необработанные клетки того же штамма, барьер клеточной мембраны, способствующий селективному потреблению углеводов по отношению к ГОС. Добавление 15 г/л клеток в разбавленные до 10 % смеси позволило повысить чистоту ГОС до 85 % через 9 ч, через 15 ч – полностью удалить нежелательные углеводы (моносахариды и лактозу). После 9 циклов применения клеток эффективность очистки снизилась примерно на 10 %, что можно компенсировать путем добавления свежих клеток перед каждым новым циклом. Предложенная авторами стратегия имеет такие преимущества, как высокая стабильность и возможность повторного использования клеток дрожжей в пермеабиллизированной и необработанной форме, а также этанола, образующегося при сбраживании лактозы во время очистки для пермеабиллизации клеток [59].

Клетки штамма *K. lactis* CCT 7735 использовали для снижения содержания лактозы в неочищенном ГОС как при ферментации, так и в результате после-

дующей биоконверсии. Пермеабелизованные в 50 % этаноле в течение 15 мин клетки показали высокую эффективность очистки ГОС, сопоставимую с ферментным препаратом *K. lactis* Lactase NL, иммобилизованным на глиоксаль-агарозных гранулах. Обе формы биокатализаторов позволили снизить содержание лактозы на 70 % с повышением чистоты ГОС на 20 % за счет синтеза 6-галактобиозы и аллолактозы при 35 °C и pH 6,5 в 50 % углеводных сиропах. Дополнительная селективная биоконверсия оставшейся лактозы и образовавшихся глюкозы и галактозы с использованием живых клеток этого же штамма потребовала разведения сиропов до 20 %, но привела к получению ГОС с очень высокой чистотой (96 %). Авторы отмечают, что требуются дополнительные исследования по возможности многократного использования живых и пермеабелизованных клеток дрожжей [83].

Еще одно направление в биоочистке ГОС связано с комбинированным применением *Kluyveromyces* и дрожжей других родов. Сочетание *K. marxianus* NRLLY-1109 и *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 использовали для очистки сложной смеси олигосахаридов, полученной под воздействием бета-галактозидазы *A. oryzae* и содержащих ГОС, фруктоолисахариды (ФОС) и лактулозу. Это позволило полностью утилизировать моносахариды и получить продукт с чистотой 48 %. Показана возможность восстановления дрожжей и их повторного использования [84]. Другой вид *Kluyveromyces*, *K. lactis*, применили для обогащения смеси, содержащей 38 % ГОС, после ее обработки *S. cerevisiae*. Такая двойная очистка привела к повышению относительного содержания ГОС на 27 %. Клетки были использованы многократно, в 10 циклах без существенного снижения производительности. Очищенный продукт показал хороший пребиотический потенциал, особенно в плане увеличения антагонистической активности *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus plantarum* в отношении *Escherichia coli* и *Citrobacter* по сравнению с коммерческими продуктами ГОС, ФОС и инулином [85].

Разные виды и штаммы дрожжей были оценены с точки зрения эффективности очистки продукта Vivinal GOS (Friesland Campina, Нидерланды) [86]. Сначала из 75 штаммов отобрали 34, способных усваивать лактозу. 12 штаммов, показавших хороший рост в минимальных средах с лактозой, протестировали на осмотическую чувствительность к глюкозе, лактозе и ГОС. По совокупности свойств для экспериментов по одноэтапной ферментации сиропа ГОС с целью удаления глюкозы и лактозы выбрали штаммы *K. lactis* DMB Kl-RK, *K. marxianus* DMB Km-RK и *Kluyveromyces nonfermentans* NCAIM Y.01443. Штаммы *K. lactis* и *K. marxianus* показали самую высокую скорость утилизации глюкозы из разведенных до 10 % концентрации растворов ГОС. Снижение содержания лактозы и галактозы было более заметно, если в растворы добавляли дрожжевой экстракт. При этом ГОС

не расщеплялись, и их чистота повышалась до 91,5 % с *K. lactis* и до 100 % с *K. marxianus* через 24 ч при 30 °C, но выделялось значительное количество этанола (до 4 %), что требовало дополнительной очистки. *K. nonfermentans* медленнее перерабатывал глюкозу и лактозу, в результате чего чистота ГОС даже после внесения дрожжевого экстракта не превышала 52 %, однако смесь при этом не содержала моносахаридов и спирта. Для двухэтапной ферментации сначала использовали дрожжи *Cyberlindnera jadinii* (анаморф *Candida utilis*) NCAIM Y.00499, которые наиболее активно метаболизировали глюкозу в растворах ГОС, после чего добавляли лактозосбраживающие дрожжи рода *Kluyveromyces*. Самую высокую эффективность (до чистоты ГОС 92 %) показало сочетание *C. jadinii* и *K. lactis* при использовании 10 % растворов ГОС и внесении дрожжевого экстракта [86].

В рассмотренных публикациях много внимания уделяется механизмам очистки и точности воздействия на определенные углеводы. Клетки *K. lactis* CICC 1772 были использованы для очистки ГОС, синтезированных бета-галактозидазой из *L. plantarum*. Сначала процесс моделировали и определяли влияние концентрации инокулята дрожжей и сухих веществ в растворе на эффективность очистки. Самый высокий выход ГОС (около 90 %) получили через 20 ч ферментации. В качестве оптимальных выбрали условия с 75 г/л клеток дрожжей и 8 ч обработки 10 % модельных растворов, в результате чего степень чистоты ГОС повысилась с 30 до 75 %. При мониторинге активности ферментов, связанных с метаболизмом углеводов, обнаружили снижение этого показателя для бета-галактозидазы и гексокиназы на первом этапе реакции, после чего у первого фермента он стабилизировался, а у второго – увеличился. Медленный рост активности зафиксирован и у пируваткиназы. Удаление лактозы и моносахаридов сопровождалось также значительными изменениями на уровне мРНК. Авторы считают, что на первом этапе синтез ферментов был заблокирован, но в дальнейшем рост клеток возобновился за счет потребления лактозы, ускорения метаболизма глюкозы и транспорта веществ [87]. Полученные данные согласуются с известными положениями о том, что механизмы метаболизма углеводов дрожжей подразумевают сложные регуляторные схемы для индукции и репрессии генов, предположительно связанные с иерархическим потреблением различных источников углерода [12].

При использовании другого штамма, *K. lactis* CICC 1773, максимальная чистота ГОС была достигнута при той же концентрации клеток (75 г/л), но спустя 12 ч обработки 5 % растворов. После низкотемпературной дистилляции этанола, образовавшегося в результате сбраживания углеводов, чистота ГОС достигла 90 %. ГОС формирует комплексы с казеином в модели кислотной ферментации с помощью δ -лактона D-(+)-глюконовой кислоты, при этом реологические показа-

тели сгустка зависят от концентрации ГОС. Внесение 4–6 % ГОС приводило к повышению влагоудерживающей способности и стабильности системы благодаря формированию различных форм молекулярных взаимодействий между ГОС и казеином, а также изменению его вторичной структуры [88].

Коммерческий продукт, Biotis (Friesland Campina, Нидерланды), полученный с бета-галактозидазой *Papiliotrema terrestris* и содержащий 63 % ГОС, был подвергнут комплексной очистке. Сначала добавляли лактазу *K. lactis* (Maxilact LGi 5000, DSM, Нидерланды) для гидролиза оставшейся лактозы в глюкозу и галактозу, после чего они удалялись с помощью последовательной хроматографии с имитацией движущегося слоя. Максимальная чистота ГОС (около 96 %) после гидролиза была достигнута в разбавленном до 45 % (по сухим веществам) сиропе ГОС при дозе фермента 1,5 мг/г. Однако при этом терялась часть олигосахаридов со степенью полимеризации > 2 и нелактозных дисахаридов, стимулирующих рост бифидобактерий и принимающих участие в прямом защитном воздействии ГОС на эпителий кишечника. Поэтому авторы выбрали более низкие дозы фермента (0,5–1,0 мг/г), при которых чистота была на 2–5 % меньше, но все ценные фракции углеводов сохранялись. Продукт после очистки оказывал схожий с неочищенным препаратом эффект на состав микробиоты кишечника *in vitro* [89].

Так как селективная биоконверсия позволяет существенно повысить чистоту ГОС экономически выгодным и экологически безопасным путем, эта стратегия уже нашла применение в промышленных производственных процессах. Однако образование дрожжами некоторых продуктов метаболизма углеводов (например, этанола) может быть нежелательным и потребовать дополнительных стадий очистки [12].

Выводы

Дрожжи рода *Kluyveromyces* успешно используют в современном производстве ГОС в качестве продуцентов бета-галактозидаз, выполняющих в концентрированных растворах дисахарида лактозы двойную функцию – гидролаз и псевдотрансфераз. Выход ГОС с этими ферментами обычно достигает 30–40 %, что сопоставимо с другими продуцентами, но требует поиска методов его повышения. В результате реакции можно достичь высоких степеней (более 90 %) конверсии лактозы, это значительно выше, чем при использовании других ферментов, и позволяет получать низко- и безлактозные продукты, обогащенные ГОС.

Бета-галактозидазы *Kluyveromyces lactis* наиболее часто применяют для гидролиза лактозы и биосинтеза ГОС. Они имеют сложную тетрамерную структуру, отличаются нестабильностью, данные об оптимальных условиях их действия значительно варьируют в разных источниках. Результаты исследований не позволяют говорить о прямой зависимости между гидролитической и трансферазной активностью этих ферментов.

В составе ГОС, полученных с лактазами *K. lactis*, обнаружены в основном трисахариды и дисахариды, отличные от лактозы по структуре. Один из путей повышения выхода ГОС и разнообразия их структур связан с поиском новых продуцентов более эффективных ферментов. В этом плане представляют интерес бета-галактозидазы другого вида, *Kluyveromyces marxianus*, показывающие хорошую способность к трансгалактозилрованию и работе в разных видах молочного сырья, а также к комбинированию ферментов разных продуцентов (штамм, вид и род). Для повышения устойчивости могут быть использованы различные способы иммобилизации, в т. ч. с использованием собственных клеточных структур дрожжей.

Преимущества применения лактаз *Kluyveromyces* особенно ярко проявляются в молочном сырье, где они, как правило, действуют более эффективно, чем ферменты других продуцентов. Тенденция замены растворов лактозы на молоко, сыворотку и ее пермеаты является одной из наиболее выраженных в получении ГОС. Прямой биосинтез без дополнительной очистки привлекает возможностью получения недорогих функциональных продуктов. Это соответствует запросам потребителей, все больше предпочитающих натуральные продукты с полезными для здоровья свойствами.

Еще одна актуальная задача – оптимизация процессов биосинтеза и очистки ГОС. Кроме свойств и формы применения фермента, на них влияют и другие факторы – концентрация углеводов и неуглеводных компонентов в растворе, температура, pH и продолжительность реакций. Особенно сложными являются процессы, которые протекают в молочном сырье, что может быть обусловлено влиянием белковых и минеральных веществ. Вопросы, связанные с моделированием таких процессов, а также задачами определения наиболее оптимальных параметров в условиях многозадачности с использованием современных математических методов, требуют пристального внимания и изучения со стороны исследователей.

Наиболее привлекательной особенностью *Kluyveromyces* является возможность их комбинированного применения и в синтезе, и в очистке ГОС. Выращивание этих дрожжей в побочном молочном сырье, применение образовавшегося при этом этанола с целью пермеабиллизации клеток для их использования в виде цельноклеточных ферментов при синтезе ГОС, а целых клеток – для очистки получившихся смесей от лактозы и моносахаридов представляет собой хороший пример формирования замкнутого цикла использования сырья, выгодного с точки зрения экономических показателей и экологии.

Таким образом, к перспективным направлениям исследований можно отнести использование побочного молочного сырья для получения продуктов с ГОС, комбинированное применение ферментов разных продуцентов, а также комплексное применение бета-галактозидаз *Kluyveromyces* для биосинтеза и очистки ГОС.

Критерии авторства

С. А. Рябцева – концептуализация, курирование данных, методология, проверка, визуализация, написание оригинального черновика, обзор и редактирование; М. А. Шпак – курирование данных, формальный анализ, исследование, проверка, обзор и редактирование; С. Н. Сазанова – формальный анализ, исследование, обзор и редактирование.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

S.A. Ryabtseva was responsible for the research concept, data curation, methodology, validation, visualization, and original draft; M.A. Shpak provided the data curation, formal analysis, research, review, and proofreading; S.N. Sazanova performed the formal analysis, research, review, and proofreading.

Conflict of interest

The authors declared no potential conflict of interest regarding the research, authorship, and / or publication of this article.

Список литературы / References

1. Souza AFC, Gabardo S, de Jesus Silva Coelho R. Galactooligosaccharides: Physiological benefits, production strategies, and industrial application. *Journal of Biotechnology*. 2022;359:116–129. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.09.020>
2. Ambrogi V, Bottacini F, Cao L, Kuipers B, Schoterman M, et al. Galacto-oligosaccharides as infant prebiotics: Production, application, bioactive activities and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023;63(6):753–766. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1953437>
3. Global galactooligosaccharides market overview. *Market Research Future*. [cited 2025 Mar 27]. Available from: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/galactooligosaccharides-market-22433>
4. Martins GN, Ureta MM, Tymczyszyn EE, Castilho PC, Gomez-Zavaglia A. Technological aspects of the production of fructo and galacto-oligosaccharides. *Enzymatic synthesis and hydrolysis. Frontiers in Nutrition*. 2019;6:78. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00078>
5. Guerrero C, Vera C, Illanes A. Optimisation of synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (fructosyl-galactooligosaccharides) with β -galactosidases of different origin. *Food Chemistry*. 2013;138(4):2225–2232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.128>
6. Arnold JW, Whittington HD, Dagher SF, Roach J, Azcarate-Peril MA, et al. Safety and modulatory effects of humanized galacto-oligosaccharides on the gut microbiome. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8:640100. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.640100>
7. Ignatova I, Arsov A, Petrova P, Petrov K. Prebiotic effects of α - and β -galactooligosaccharides: The structure-function relation. *Molecules*. 2025;30(4):803. <https://doi.org/10.3390/molecules30040803>
8. Deshmukh N, Rao PS, Sharma H, Sathish Kumar MH, Naik NL, et al. Waste to nutrition: The evolution of whey, a byproduct to galactooligosaccharides production. *Food Chemistry Advances*. 2024;4:100642. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100642>
9. Maráz A, Kovács Z, Benjamins E, Pázmándi M. Recent developments in microbial production of high-purity galactooligosaccharides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;38(6):95. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03279-4>
10. Žolnere K, Ciproviča I. The comparison of commercially available β -galactosidases for dairy industry: Review. *Food Science. Research for Rural Development*. 2017;1:215–222. <https://doi.org/10.22616/rrd.23.2017.032>
11. Chen X, de Vos P. Structure-function relationship and impact on the gut-immune barrier function of non-digestible carbohydrates and human milk oligosaccharides applicable for infant formula. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2024;64(23):8325–8345. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2199072>
12. Vera C, Guerrero C, Illanes A. Trends in lactose-derived bioactives: Synthesis and purification. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. 2022;2:393–412. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00068-2>
13. Torres DPM, Gonçalves M do PF, Teixeira JA, Rodrigues LR. Galacto-oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010;9(5):438–454. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>
14. de Albuquerque TL, de Sousa M, Gomes E, Silva NC, Girão Neto CAC, et al. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;191:881–898. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>
15. Лютова Л. В., Наумов Г. И., Шнырева А. В., Наумова Е. С. Молекулярный полиморфизм β -галактозидазных генов *LAC4* у молочных и природных штаммов дрожжей *Kluyveromyces*. Молекулярная биология. 2021. Т. 55. № 1. С. 75–85. [Lyutova LV, Naumov GI, Naumova ES, Shnyreva AV. Molecular polymorphism of β -galactosidase *LAC4* genes in dairy and natural strains of *Kluyveromyces* yeasts. *Molecular Biology*. 2021;55(1):66–74. (In Russ.)] <https://doi.org/10.31857/S0026898421010109>

16. Лютова Л. В., Наумова Е. С. Межштаммовая гибридизация дрожжей *Kluyveromyces lactis* для создания штаммов, активно сбраживающих лактозу. Биотехнология. 2021. Т. 37. № 4. С. 43–50. [Lyutova LV, Naumova ES. Inter-strain hybridization of *Kluyveromyces lactis* for creating efficient lactose-fermenting yeast. Biotekhnologiya. 2021;37(4):43–50. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/XZBKCB>
17. Лютова Л. В., Наумова Е. С. Сравнительный анализ сбраживания лактозы и ее компонентов, глюкозы и галактозы, межштаммовыми гибридами молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis*. Биотехнология. 2023. Т. 39. № 1. С. 3–11. [Lyutova LV, Naumova ES. Comparative analysis of fermentation of lactose and its components, glucose and galactose, by interstrain hybrids of dairy yeast *Kluyveromyces lactis*. Biotekhnologiya. 2023;39(1):3–11. (In Russ.)] <https://doi.org/10.56304/s0234275823010064>
18. Rodriguez-Colinas B, Fernandez-Arrojo L, Ballesteros AO, Plou FJ. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. Food Chemistry. 2014;145:388–394. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.060>
19. Liburdi K, Esti M. Galacto-oligosaccharide (GOS) synthesis during enzymatic lactose-free milk production: State of the art and emerging opportunities. Beverages. 2022;8(2):21. <https://doi.org/10.3390/beverages8020021>
20. Fischer C, Kleinschmidt T. Synthesis of galactooligosaccharides in milk and whey: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2018;17(3):678–697. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12344>
21. Gänzle MG, Haase G, Jelen P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. International Dairy Journal. 2008;18(7):685–694. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.003>
22. Guerrero C, Vera C, Conejeros R, Illanes A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. Enzyme and Microbial Technology. 2015;70:9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
23. Böger M, van Leeuwen SS, van Bueren AL, Dijkhuizen L. Structural identity of galactooligosaccharide molecules selectively utilized by single cultures of probiotic bacterial strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2019;67(50):13969–13977. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05968>
24. van Leeuwen SS, Kuipers BJH, Dijkhuizen L, Kamerling JP. Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products. Carbohydrate Research. 2016;425:48–58. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.03.006>
25. Logtenberg MJ, Donners KMH, Vink JCM, van Leeuwen SS, de Waard P, *et al.* Touching the high complexity of prebiotic vivinal galacto-oligosaccharides using porous graphitic carbon ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2020;68(29):7800–7808. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02684>
26. Kruschitz A, Nidetzky B. Downstream processing technologies in the biocatalytic production of oligosaccharides. Biotechnology Advances. 2020;43:107568. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107568>
27. Cao T, Pázmándi M, Galambos I, Kovács Z. Continuous production of galacto-oligosaccharides by an enzyme membrane reactor utilizing free enzymes. Membranes. 2020;10(9):203. <https://doi.org/10.3390/membranes10090203>
28. Botelho VA, Mateus M, Petrus JCC, de Pinho MN. Membrane bioreactor for simultaneous synthesis and fractionation of oligosaccharides. Membranes. 2022;12(2):171. <https://doi.org/10.3390/membranes12020171>
29. Córdova A, Astudillo C, Giorno L, Guerrero C, Conidi C, *et al.* Nanofiltration potential for the purification of highly concentrated enzymatically produced oligosaccharides. Food and Bioprocess Processing 2016;98:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.11.005>
30. Information on EC 3.2.1.23 – beta-galactosidase. BRENDA. [cited 2025 Apr 21]. (In Russ.) Available from: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.23>
31. Храмов А. Г., Рябцева С. А., Панфилова А. А., Родная А. Б., Лодыгин А. Д. Применение дрожжей-продуцентов бета-галактозидаз для получения галактоолигосахаридов из лактозосодержащего сырья. Хранение и переработка сельхозсырья. 2012. № 8. С. 36–39. [Khramtsov AG, Ryabtseva SA, Panfilova AA, Rodnaya AB, Lodygin AD. Yeast-producers of beta-galactosidases application for galactooligosaccharides production from lactose containing raw material. Storage and Processing of Farm Products. 2012;(8):36–39. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/PDHUFT>
32. Qiu Y, Lei P, Wang R, Sun L, Luo Z, *et al.* *Kluyveromyces* as promising yeast cell factories for industrial bio-production: From bio-functional design to applications. Biotechnology Advances. 2023;64:108125. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108125>
33. Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, *et al.* Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021. EFSA Journal. 2022;20(1):e07045.
34. Spohner SC, Schaum V, Quitmann H, Czermak P. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. Journal of Biotechnology. 2016;222:104–116. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.023>
35. Reina-Posso D, Gonzales-Zubiate FA. Expanding horizons: The untapped potential of *Kluyveromyces marxianus* in biotechnological applications. Fermentation. 2025;11(2):98. <https://doi.org/10.3390/fermentation11020098>

36. Pereira-Rodríguez A, Fernández-Leiro R, González-Siso MI, Cerdán ME, Becerra M, et al. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology*. 2012;177(2):392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>
37. P00723 (BGAL_KLULA). SWISS-MODEL. [cited 2025 Apr 21]. (In Russ.) Available from: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P00723?template=3ob8>
38. O'Connell S, Walsh G. Purification and properties of a β -galactosidase with potential application as a digestive supplement. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007;141:1–14. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9206-4>
39. Yin H, Bultema JB, Dijkhuizen L, van Leeuwen SS. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*. 2017;225:230–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>
40. González-Delgado I, López-Muñoz M-J, Morales G, Segura Y. Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *International Dairy Journal*. 2016;61:211–219. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.007>
41. Rico-Rodríguez F, Noriega MA, Lancheros R, Serrato-Bermúdez JC. Kinetics of galactooligosaccharide (GOS) production with two β -galactosidases combined: Mathematical model and raw material effects. *International Dairy Journal*. 2021;118:105015. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105015>
42. Fischer C, Kleinschmidt T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*. 2015;48:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>
43. Frenzel M, Zerge K, Clawin-Rädecker I, Lorenzen PC. Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β -galactosidases. *LWT – Food Science and Technology*. 2015;60(2, Part 1):1068–1071. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.064>
44. Botvynko A, Bednářová A, Henke S, Shakhno N, Čurda L. Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial β -galactosidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;517(4):762–766. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.001>
45. Singh P, Arora S, Rao PS, Kathuria D, Sharma V, et al. Effect of process parameters on the β -galactosidase hydrolysis of lactose and galactooligosaccharide formation in concentrated skim milk. *Food Chemistry*. 2022;393:133355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133355>
46. Mano MCR, Paulino BN, Pastore GM. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Research International*. 2019;124:78–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>
47. Padilla B, Ruiz-Matute AI, Belloch C, Cardelle-Cobas A, Corzo N, et al. Evaluation of oligosaccharide synthesis from lactose and lactulose using β -galactosidases from *Kluyveromyces* isolated from artisanal cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(20):5134–5141. <https://doi.org/10.1021/jf300852s>
48. Petrova VY, Kujumdzieva AV. Thermotolerant yeast strains producers of galacto-oligosaccharides. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2010;24(1):1612–1619. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0014-6>
49. Srivastava A, Mishra S, Chand S. Synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose using immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016;123:147–153. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.11.017>
50. Srivastava A, Rastogi A, Jaswal AS, Sahu JK, Agarwal GP, et al. Nanofiltration-based purification process for whole-cell transformed prebiotic galactooligosaccharides. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2025;48:621–631. <https://doi.org/10.1007/s00449-025-03132-6>
51. Srivastava A, Mishra S, Chand S. Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *New Biotechnology*. 2015;32(4):412–418. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.04.004>
52. Botvynko A, Synytsya A, Čurda L. Synthesis of galactooligosaccharides with four β -galactosidases: Structural comparison of the products by HPLC, ESI-MS and NMR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2025;744:151204. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.151204>
53. Rodríguez-Colinas B, de Abreu MA, Fernández-Arrojo L, de Beer R, Poveda A, et al. Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(19):10477–10484. <https://doi.org/10.1021/jf2022012>
54. van Trijp MPH, Rios-Morales M, Logtenberg MJ, Keshtkar S, Afman LA, et al. Detailed analysis of prebiotic fructo- and galacto-oligosaccharides in the human small intestine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2024;72(38):21152–21165. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c03881>
55. Ferreira-Lazarte A, Gallego-Lobillo P, Moreno FJ, Villamiel M, Hernández-Hernández O. *In vitro* digestibility of galactooligosaccharides: Effect of the structural features on their intestinal degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(16):4662–4670. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00417>
56. Akbari P, Fink-Gremmels J, Willems RHAM, Difilippo E, Schols HA, et al. Characterizing microbiota-independent effects of oligosaccharides on intestinal epithelial cells: Insight into the role of structure and size. *European Journal of Nutrition*. 2017;56(5):1919–1930. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1234-9>

57. Figueroa-Lozano S, Ren C, Yin H, Pham H, van Leeuwen S, *et al.* The impact of oligosaccharide content, glycosidic linkages and lactose content of galacto-oligosaccharides (GOS) on the expression of mucus-related genes in goblet cells. *Food & Function*. 2020;11(4):3506–3515. <https://doi.org/10.1039/d0fo00064g>
58. Teymennet-Ramírez KV, Martínez-Morales F, Trejo-Hernández MR. Yeast surface display system: Strategies for improvement and biotechnological applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;9:794742. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794742>
59. Sun H, You S, Wang M, Qi W, Su R, *et al.* Recyclable strategy for the production of high-purity galacto-oligosaccharides by *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(28):5679–5685. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01531>
60. González-Cataño F, Tovar-Castro L, Castaño-Tostado E, Regalado-Gonzalez C, García-Almendarez B, *et al.* Improvement of covalent immobilization procedure of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for galactooligosaccharides production: Modeling and kinetic study. *Biotechnology Progress*. 2017;33(6):1568–1578. <https://doi.org/10.1002/btpr.2509>
61. Misson M, Dai S, Jin B, Chen BH, Zhang H. Manipulation of nanofiber-based β -galactosidase nanoenvironment for enhancement of galacto-oligosaccharide production. *Journal of Biotechnology*. 2016;222:56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.014>
62. Misson M, Jin B, Dai S, Zhang H. Interfacial biocatalytic performance of nanofiber-supported β -galactosidase for production of galacto-oligosaccharides. *Catalysts*. 2020;10(1):81. <https://doi.org/10.3390/catal10010081>
63. Majore K, Ciprovica I. Bioconversion of lactose into glucose–galactose syrup by two-stage enzymatic hydrolysis. *Foods*. 2022;11(3):400. <https://doi.org/10.3390/foods11030400>
64. Bolognesi LS, Gabardo S, Dall Cortivo PR, Ayub MAZ. Biotechnological production of galactooligosaccharides (GOS) using *porungo* cheese whey. *Food Science and Technology*. 2022;42:e64520. <https://doi.org/10.1590/fst.64520>
65. Chenafa A, Abdo AAA, Mahdi AA, Zhang Q, Chen C, *et al.* Functionalized electrospun nanofibers to enhance β -Galactosidase immobilization and catalytic activity for efficient galactooligosaccharide synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;270:132312. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132312>
66. Xuan Z, Wang K, Duan F, Lu L. Non-carrier immobilization of yeast cells by genipin crosslinking for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from plant-derived galactose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024; 277(Part 1):133991. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133991>
67. Ren H, Fei J, Shi X, Zhao T, Cheng H, *et al.* Continuous ultrafiltration membrane reactor coupled with nanofiltration for the enzymatic synthesis and purification of galactosyl-oligosaccharides. *Separation and Purification Technology*. 2015;144: 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.02.020>
68. Рябцева С. А., Котова А. А., Скрипнюк А. А. Синтез галактоолигосахаридов с использованием дрожжей *Kl. marxianus* и термофильного стрептококка. Молочная промышленность. 2017. № 6. С. 62–64. [Ryabtseva SA, Kotova AA, Skripnyuk AA. Synthesis of galactooligosaccharides using *Kl. marxianus* and streptococcus thermophilus. *Dairy industry*. 2017; (6):62–64. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/YULXGF>
69. Fischer C, Kleinschmidt T. Combination of two β -galactosidases during the synthesis of galactooligosaccharides may enhance yield and structural diversity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;506(1):211–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.091>
70. Fischer C, Kleinschmidt T. Effect of glucose depletion during the synthesis of galactooligosaccharides using a trienzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*. 2019;121:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.10.009>
71. Rico-Rodríguez F, Serrato JC, Montilla A, Villamiel M. Impact of ultrasound on galactooligosaccharides and gluconic acid production throughout a multienzymatic system. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018;44:177–183. <https://doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2018.02.022>
72. Ponnusamy V, Sankaranarayanan M. Targeted gene manipulation of Leloir pathway genes for the constitutive expression of β -galactosidase and its transgalactosylation product galacto-oligosaccharides from *Kluyveromyces lactis* GG799 and knockout strains. *Enzyme and Microbial Technology*. 2023;169:110263. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110263>
73. Kaczyński ŁK, Cais-Sokolińska D, Szwengiel A. Kinetics of lactose hydrolysis and galactooligosaccharides formation in beverages based on goat's milk and its permeate. *Food Science and Biotechnology*. 2019;28(5):1529–1534. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00600-0>
74. Limnaios A, Tsevdou M, Tsika E, Korialou N, Zerva A, *et al.* Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from acid whey catalyzed by a novel β -galactosidase from *Thermothielavioides terrestris* and commercial lactases: A comparative study. *Catalysts*. 2023;13(10):1360. <https://doi.org/10.3390/catal13101360>
75. Limnaios A, Tsevdou M, Zafeiri E, Topakas E, Taoukis P. Cheese and yogurt by-products as valuable ingredients for the production of prebiotic oligosaccharides. *Dairy*. 2024;5(1):78–92. <https://doi.org/10.3390/dairy5010007>
76. Guron GKP, Hotchkiss ATJr, Bodnar BH, Harron A, Renye JAJr, *et al.* Oligosaccharide production using β -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus* and *Kluyveromyces lactis* in sweetened reconstituted nonfat dry milk. *Journal of Dairy Science*. 2025;108(6):5696–5704. <https://doi.org/10.3168/jds.2025-26396>

77. Hoyos JD, Noriega MA, Riascos CAM. Modeling and simulation of the enzymatic kinetics for the production of Galactooligosaccharides (GOS) using an Artificial Neural Network hybrid model. Digital Chemical Engineering. 2023;9:100132. <https://doi.org/10.1016/j.dche.2023.100132>
78. Rico-Rodríguez F, Villamiel M, Ruiz-Aceituno L, Serrato JC, Montilla A. Effect of the lactose source on the ultrasound-assisted enzymatic production of galactooligosaccharides and gluconic acid. Ultrasonics Sonochemistry. 2020;67:104945. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104945>
79. Córdova A, Astudillo-Castro C, Henriquez P, Manriquez N, Nuñez H, et al. Ultrasound-assisted enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides using native whey with two commercial β -galactosidases: *Aspergillus oryzae* and *Kluyveromyces var lactis*. Food Chemistry. 2023;426:136526. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136526>
80. Jarrard TR, Brock E, Hansen LD, Kenealey JD. Measuring β -galactosidase activity in opaque dairy solutions under optimum conditions for galactooligosaccharide synthesis by isothermal titration calorimetry. Journal of Dairy Science. 2023;106(12):8312–8320. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23400>
81. Yeo I-S, Yoon Y-J, Seo N, An HJ, Kim J-H. Biopurification of oligosaccharides by immobilized *Kluyveromyces lactis*. Applied Sciences. 2019;9(14):2845. <https://doi.org/10.3390/app9142845>
82. Tokošová S, Hronská H, Rosenberg M. Production of high-content galacto-oligosaccharides mixture using β -galactosidase and *Kluyveromyces marxianus* entrapped in polyvinylalcohol gel. Chemical Papers. 2016;70:1445–1451. <https://doi.org/10.1515/chempap-2016-0081>
83. Santibáñez L, Guerrero C, Illanes A. Raw galacto-oligosaccharide purification by consecutive lactose hydrolysis and selective bioconversion. International Dairy Journal. 2017;75:91–100. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.07.008>
84. Guerrero C, Vera C, Illanes A. Selective bioconversion with yeast for the purification of raw lactulose and trans-galactosylated oligosaccharides. International Dairy Journal. 2018;81:131–137. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.02.003>
85. Srivastava A, Mishra S. Enrichment and evaluation of galactooligosaccharides produced by whole cell treatment of sugar reaction mixture. Molecular Biology Reports. 2019;46:1181–1188. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04585-1>
86. Pázmándi M, Kovács Z, Balga E, Kovács M, Maráz A. Production of high-purity galacto-oligosaccharides by depleting glucose and lactose from galacto-oligosaccharide syrup with yeasts. Yeast. 2020;37(9–10):515–530. <https://doi.org/10.1002/yea.3507>
87. Zhang X, Yao C, Wang T, Zhao H, Zhang B. Production of high-purity galacto-oligosaccharides (GOS) by *Lactobacillus*-derived β -galactosidase. European Food Research and Technology. 2021;247:1501–1510. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03727-9>
88. Li Z, Tian-Tian L, Aziz T, Min Z, Sarwar A, et al. Purification of galacto-oligosaccharide (GOS) by fermentation with *Kluyveromyces lactis* and interaction between GOS and casein under simulated acidic fermentation conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2023;39(12):342. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03791-1>
89. Cao L, Bultsma M, Wissing J, Gerhard BE, Ziegler M, et al. High purity galacto-oligosaccharides: Optimal process design and prebiotic effect. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2023;30:100387. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2023.100387>