

MAREK ADAMCZAK, WŁODZIMIERZ BEDNARSKI

## ENZYMATYCZNA SYNTEZA GALAKTOOLIGOSACHARYDÓW I LAKTULOZY W PERMEACIE PO ULTRAFILTRACJI SERWATKI

### Streszczenie

Przedstawiono wyniki badań dotyczące technologicznych możliwości sterowania procesem transgalaktozylacji laktozy, katalizowanym przez handlowe preparaty  $\beta$ -galaktozydazy, w permeacie po ultrafiltracji serwatki, w celu poprawy wydajności syntezy galaktooligosacharydów (GOS) i/lub laktulozy. Wykazano, że o wydajności procesu decyduje dobór preparatu  $\beta$ -galaktozydazy, stężenie substratu, a w syntezie laktulozy proporcja laktozy i fruktozy dodawanej do mieszaniny reakcyjnej. Uzyskaną wydajność syntezy GOS, a przede wszystkim laktulozy w ilości 65 g/dm<sup>3</sup>, można uznać jako zadowalającą. Korzystną zawartość GOS, tj. 13,7 %, w sacharydach uzyskano po procesie prowadzonym w 10 % roztworze laktozy, w reakcji katalizowanej przez Ha-Lactase. Efektem przeprowadzonych badań jest propozycja technologii koncentratów GOS lub laktulozy (zagęszczonych lub suszonych) z wykorzystaniem (jako źródła laktozy) permeatu po ultrafiltracji mleka lub serwatki. Otrzymane koncentraty galaktooligosacharydów można stosować jako źródło prebiotyków do produkcji prozdrowotnej żywności, pasz lub preparatów farmaceutycznych. Zaproponowana technologia pozwala na bezodpadowe zagospodarowanie permeatów po UF mleka lub serwatki.

W dalszych pracach z tego zakresu planowane są doświadczenia mające na celu ocenę warunków ciągłej syntezy GOS i/lub laktulozy z użyciem immobilizowanych enzymów.

**Słowa kluczowe:**  $\beta$ -galaktozydaza, permeat serwatki, transgalaktozylacja, galaktooligosacharydy (GOS), laktuloza

### Wprowadzenie

Galaktooligosacharydy (GOS) są naturalnymi składnikami mleka, a także niektórych owoców i warzyw. GOS traktowano jako mało ważne składniki żywności, m.in. ze względu na niewielką słodkość, słabą rozpuszczalność w wodzie i małą strawność. Obecnie GOS zalicza się do prebiotyków, tj. składników żywności nieulegających trawieniu w górnych odcinkach przewodu pokarmowego i będących składnikiem odżywczym dla pożytecznych bakterii bytujących w okrężnicy, głównie z rodzaju *Bifido-*

*bacterium* i *Lactobacillus*. Zaleca się spożywanie GOS w dawce około 3 g dziennie, a produkty zawierające GOS zalicza się do żywności prozdrowotnej. Znajdują zastosowanie jako zamienniki sacharozy m.in. do produkcji gumy do żucia oraz żywności funkcjonalnej dla diabetyków i osób starszych. Preparaty galaktooligosacharydów stosowane są w produkcji odżywek dla dzieci, jogurtów, deserów, mleka lub maślanki w proszku [6].

GOS stosowane są także do produkcji farmaceutyków wspomagających przyswajanie wapnia, środków przeciwpróchnicznych, leków przeciw zaparciom [21, 23, 25].

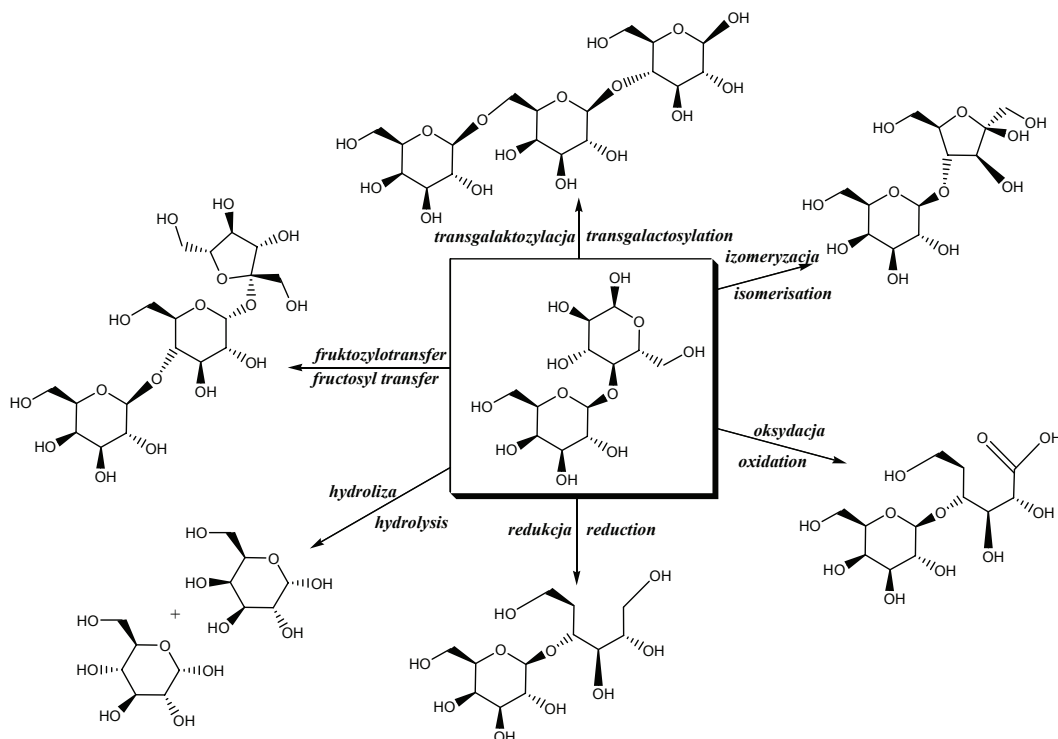
Reakcje syntezy galaktooligosacharydów katalizują glikozydazy (EC 3.2.1.X), a najpowszechniej stosowane są  $\beta$ -galaktozydazy (EC 3.2.1.23). Enzymy te katalizują hydrolizę wiązań *O*-glikozydowych w  $\beta$ -D-galaktozydach, np. wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowego w laktozie, ale również reakcję transgalaktozylacji. W zależności od warunków reakcji enzymatycznej reszta cukrowa tworząca glikonową część laktozy może być przenoszona na różne akceptory. Jeśli akceptorem donorów będzie woda to prowadzona jest hydroliza sacharydów, a jeśli będzie nim inny cukier, np. D-galaktoza to powstają GOS [29].

Laktoza, jeden z głównych składników mleka, jest jednym z głównych substratów reakcji chemicznych, których celem jest zwiększenie jej wartości użytkowej, funkcjonalnej [8] (rys. 1). Laktoza może być substratem w reakcjach hydrolizy, fruktozylo-transferu, transgalaktozylacji, izomeryzacji, oksydacji i redukcji, w wyniku których powstają odpowiednio: glukoza i galaktoza, laktosacharoza, galaktooligosacharydy, laktuloza, kwas laktobionowy i laktikol.

Zastosowanie powszechnie znanej reakcji hydrolizy laktozy w przemyśle mleczarskim może wspomagać przetwórstwo mleka i produktów ubocznych w celu: usunięcia laktozy z mleka, kontroli krystalizacji laktozy w koncentratkach mleczarskich, pełnego wykorzystania serwatki i jej permeatu, produkcji karmy dla zwierząt, syntezy oligosacharydów i egzopolisacharydów, intensyfikacji syntezy kultur starterowych, poprawy i zwiększenia syntezy związków smakowo-zapachowych, otrzymania nowych, modyfikowanych produktów, np. serów serwatkowych, serów o nowych cechach smakowo-zapachowych, produktów do smarowania pieczywa.

Obecnie duże zainteresowanie towarzyszy zastosowaniu laktozy jako substratu w reakcjach enzymatycznej syntezy prebiotycznych galaktooligosacharydów [26]. Kataliza reakcji transgalaktozylacji prowadzona jest z udziałem enzymów o różnym stopniu oczyszczenia oraz katalizatorów niewydzielonych ze struktur komórkowych (całokomórkowe, ang. whole-cell system) [10, 17, 20, 27].

W technologicznym sterowaniu reakcją syntezy galaktooligosacharydów ważny jest dobór parametrów decydujących o wydajności procesu, np. stężenie substratu, czas, temperatura i kwasowość środowiska reakcji, właściwości, pochodzenie  $\beta$ -galaktozydazy, a nawet źródło laktozy.



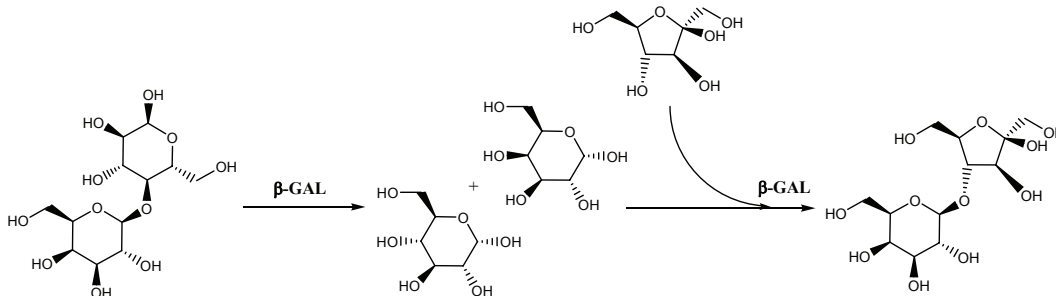
Rys. 1. Możliwości otrzymywania wartościowych produktów w wyniku modyfikacji laktozy.  
 Fig. 1. Possibilities of producing valuable products by modifying lactose.

Do sacharydów o właściwościach prebiotycznych zalicza się także laktulozę, tj. 4-*O*- $\beta$ -D-galaktopyranozyl-D-fruktozę, która jest produktem izomeryzacji laktozy [1]. Laktuloza dobrze rozpuszcza się w wodzie i jest 1,5-rza słodsza niż laktoza, a jej słodkość wobec sacharozy wynosi 0,6. Cukier ten występuje w formie 5 izomerów, z których dominująca jest  $\beta$ -D-fruktofuranaza. Z dostępnych informacji wynika, że spożywanie określonych dawek laktulozy sprzyja poprawie przyswajalności wapnia, hamuje tzw. wtórne tworzenie kwasów żółciowych, stymuluje układ odpornościowy organizmów dotkniętych marskością wątroby, stosowana jest w leczeniu chronicznej encefalopatii wątrobowej i zaparć [2, 11, 24, 26].

Laktuloza powstaje w niewielkich ilościach także podczas ogrzewania mleka i jest wskaźnikiem zakresu jego obróbki termicznej [7]. Powszechnie dostępne preparaty laktulozy są otrzymywane po chemicznej izomeryzacji laktozy w środowisku alkalicznym, z dodatkiem kwasu borowego, który korzystnie przesuwa równowagę reakcji w kierunku syntezy laktulozy i przeciwdziała reakcjom ubocznym. Charakteryzują się one słodkim smakiem, ale z wyczuwalnym obcym posmakiem i zapachem, nie zawsze

tolerowanym przez konsumentów. W poszukiwaniu alternatywnych metod izomeryzacji laktozy zwraca się uwagę na zastosowanie w tym celu preparatów  $\beta$ -galaktozydazy.

Otrzymywanie oligosacharydów z udziałem glikozydaz, w tym  $\beta$ -D-galaktozydazy jest możliwe dzięki termodynamicznie kontrolowanym reakcjom syntezy, tj. odwróconej hydrolizie, bądź dzięki kinetycznie kontrolowanym reakcjom transferu, tzw. transgalaktozylacji (rys. 2). W środowisku wodnym reakcja transgalaktozylacji konkuruje z reakcją hydrolizy [14]. Często reakcja prowadzona jest w układach heterogenych preferujących transgalaktozylację, np. w środowisku dwufazowym [3]. Problemem jest stabilność  $\beta$ -galaktozydazy w reakcji transgalaktozylacji w środowisku o subkrytycznie małym współczynniku aktywności wody ( $a_w$ ). Synteza w środowisku o małej wartości  $a_w$  nie jest zagadnieniem nowym, jednak najbardziej preferowane do tego typu zastosowań lipazy są aktywne w środowisku o wartości  $a_w=4 \times 10^{-3}$ , a  $\beta$ -galaktozydaza z migdałów wymaga do swojej aktywności środowiska o wartości  $a_w$  od 0,4 do 0,8 [30]. W celu zapewnienia korzystnej aktywności  $\beta$ -galaktozydazy konieczne jest zastosowanie metod pozwalających zwiększyć ich stabilność w środowiskach o małej wartości współczynnika  $a_w$ , np. immobilizacji enzymu [18, 22].



Rys. 2. Reakcja enzymatycznej syntezy laktulozy w wyniku transgalaktozylacji ( $\beta$ -GAL –  $\beta$ -galaktozydaza).

Fig. 2. Enzymatic reaction of lactulose synthesis resulting from the transgalactosylation catalyzed by  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL –  $\beta$ -galactosidase).

Intensyfikacji badań w tym zakresie sprzyja wzrastające zainteresowanie laktulozą stosowaną jako składnik bifidogenny (prebiotyczny) dodawany do żywności lub farmaceutyków, choć jej właściwości prebiotyczne są mniejsze niż frukto- lub galakto-oligosacharydów [26]. O opłacalności metody otrzymywania laktulozy decyduje także cena substratu. Można w tym celu zastosować koncentraty serwatki lub permeatu po jej ultrafiltracji.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono wyniki badań, których celem było ustalenie warunków syntezy GOS i/lub laktulozy w roztworach permeatu po ultrafiltracji serwatki z użyciem handlowych preparatów  $\beta$ -galaktozydazy. Podczas ustalania parametrów technologicznych zwrócono uwagę na zależność wydajności syntezy GOS

i/lub laktulozy od: rodzaju stosowanego preparatu  $\beta$ -galaktozydazy, stężenia laktozy i fruktozy w środowisku reakcji, a także czasu procesu.

### Materialy i metody badań

W doświadczeniach stosowano następujące preparaty  $\beta$ -D-galaktozydazy: Maxi-lact 2000 z *Kluyveromyces lactis* (DSM, Warszawa, Polska), Lactozym 2000L z *Kluyveromyces fragilis* (Novozymes, Polska), Ha-Lactase z *Aspergillus oryzae* (Chr. Hansen, Croatia), o aktywności enzymatycznej odpowiednio: 500, 780, 600 GAU. Aktywność preparatów enzymatycznych oznaczano z użyciem, jako substratu, roztworu *O*-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopyranozydu (ONPG). Jednostkę aktywności  $\beta$ -galaktozydazy (GAU) definiowano jako dawkę enzymu, która w warunkach oznaczenia ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 6,5$ ,  $t = 10\text{ min}$ ) uwalnia  $1\text{ }\mu\text{mol}$  *O*-nitrofenolu w ciągu 1 min [13]. W badaniach stosowano suszony permeat po ultrafiltracji serwatki, produkowany przez Zakład Mleczarski Ostrowia (Ostrów Mazowiecki), o zawartości suchej masy 97 %, w tym 75 % laktozy.

Reakcje hydrolizy laktozy z równoczesną transgalaktozylacją były prowadzone w roztworach wodnych permeatu po ultrafiltracji serwatki zawierających: 10, 20 lub 30 % laktozy, w temperaturze  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Syntezę laktulozy prowadzono w roztworze permeatu o zawartości laktozy 20 % ( $\text{pH} = 6,5$ ), wzbogacanym dodatkiem 5, 10 lub 15 % fruktozy.

Reakcje katalizowaną przez preparaty  $\beta$ -galaktozydazy dodawane w dawce odpowiadającej 40 GAU na 1 g laktozy prowadzono w łaźni wodnej o temp.  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 1 godzinę. Przebieg reakcji kontrolowano pobierając co 5 min próbki, które w celu inaktywacji enzymu ogrzewano w temp.  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 10 min, odwirowywano ( $2000\times\text{g}$ , 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), filtrowano przez filtr o porowatości  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  i poddawano analizie chromatograficznej.

Oznaczenie chromatograficzne składu sacharydów prowadzono metodą HPLC, z zastosowaniem systemu 1100 (Agilent). Fazą ruchomą była mieszanina: acetonitryl : woda dejonizowana, 75 : 25 (v:v) ( $1\text{ cm}^3/\text{min}$ ). Stosowano kolumnę Luna  $\text{NH}_2$  (Phenomenex; 250 mm, 4,6 mm,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $100\text{ \AA}$ ), termostatowaną w  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  oraz detektor laserowy światła rozproszonego, PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, UK). Temperatura odparowania i rozpylacza wynosiła odpowiednio: 90 i  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a natężenie przepływu azotu 1,5 SLPM (standardowe litry/ min). Próbki o objętości  $1\text{ }\mu\text{l}$  nanoszono do kolumny z użyciem automatycznego podajnika próbek G1313A (Agilent). Analizę chromatogramów prowadzono za pomocą oprogramowania Chem Station (Hewlett Packard).

Stosowano wzorce: fruktozy, laktozy, glukozy (POCH S.A. Gliwice), galaktozy (Merck, Poland), laktulozy, 6-*O*- $\beta$ -D-galaktopyranozyl-D-galaktopyranozydu (GOS-2),

i 4-*O*-(3-*O*- $\alpha$ -D-galaktopyranozyl- $\alpha$ -D-galaktopyranozyl)-D-galaktopyranozydu (GOS-3) (Sigma, Poznań).

Zawartość poszczególnych sacharydów (zawartość glukozy i galaktozy oznaczano łącznie) w próbkach wyrażano procentowo w stosunku do całkowitej ich zawartości we frakcji sacharydów.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczano także: stopień hydrolizy laktozy (DLH) (1), wydajność uwalniania monosacharydów (*MY*) (2) oraz wydajność syntezy laktulozy wyrażaną w procentach początkowej zawartości laktozy w mieszaninie reakcyjnej.

$$DLH = \left(1 - \frac{RL}{IL}\right) \times 100\% \quad (1)$$

$$MY = \frac{GLU + GAL}{IL} \times 100\% \quad (2)$$

gdzie:

*RL* – końcowe stężenie laktozy [g/dm<sup>3</sup>],

*IL* – początkowe stężenie laktozy [g/dm<sup>3</sup>],

*GLU*, *GAL* – stężenie glukozy i galaktozy [g/dm<sup>3</sup>].

Wyniki wszystkich doświadczeń przedstawiono jako średnie z 3 powtórzeń. Wartość odchylenia standardowego uzyskanych wyników nie przekraczała 3 %.

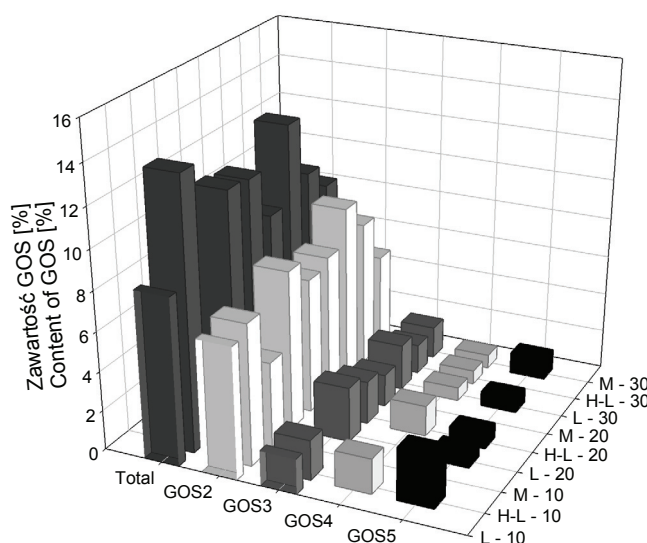
## Wyniki i dyskusja

Korzystną aktywność badanych preparatów  $\beta$ -galaktozydazy uzyskano w środowisku o pH 6,5 i temp. 40 °C. Po zwiększeniu temp. powyżej 40 °C następowało gwałtowne zmniejszenie aktywności wszystkich badanych enzymów. Stopień hydrolizy laktozy, w roztworze permeatu po ultrafiltracji (UF) serwatki (10 % laktozy), przeprowadzonej w temp. 40 °C przez 60 min wynosił: 61, 64 i 77 %, odpowiednio w reakcji katalizowanej przez Lactozym, Ha-Lactase i Maxilact. W 30 % roztworach laktozy z permeatu jej stopień hydrolizy wynosił odpowiednio: 86, 88 i 91 %.

W kolejnym etapie badań oceniano właściwości transgalaktozylacyjne stosowanych preparatów  $\beta$ -galaktozydazy. Wydajność syntezy GOS oceniano w zależności od początkowego stężenia laktozy w roztworach permeatu po UF serwatki (rys. 3). Największe zawartości GOS, w danych warunkach procesu i z danym rodzajem enzymu, uzyskano najczęściej po 20 min jego prowadzenia.

Wykazano także, że wydajność syntezy GOS oraz ich skład zależy od stężenia laktozy, czasu reakcji oraz właściwości stosowanego preparatu enzymatycznego. W procesie prowadzonym z użyciem preparatu Maxilact stwierdzono, że początkowe stężenie laktozy w roztworze permeatu decydowało o składzie chemicznym syntety-

zowanych galaktooligosacharydów. W roztworze permeatu z 10 % zawartością laktozy syntetyzowane były wyłącznie GOS-2, w mieszaninie reakcyjnej o początkowej zawartości laktozy 20 % od 20. min syntetyzowane były GOS-3, a w reakcji transgalaktozylacji w 30 % roztworze laktozy stwierdzono również obecność GOS-4 (rys. 3). Podobne zależności wykazali Cheng i wsp. [5],



Rys. 3. Wydajność syntezy GOS w zależności od: początkowego stężenia laktozy w mieszaninie reakcyjnej oraz rodzaju enzymu (L - Lactozym, H-L – Ha-Lactase, M – Maxilact; 10, 20, 30 % – początkowe stężenie laktozy w mieszaninie reakcyjnej).

Fig. 3. GOS synthesis yield depending on the initial concentration of lactose in the reaction mixture and on the type of enzyme (L - Lactozym, H-L – Ha-Lactase, M – Maxilact; 10, 20, 30 % - initial concentration of lactose in the reaction mixture).

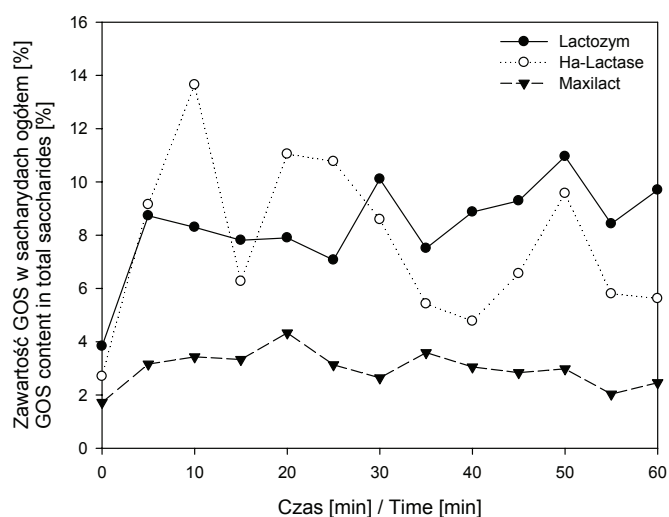
którzy w reakcji laktozy z preparatem Maxilact 2000 otrzymali galaktooligosacharydy o składzie GOS-2 : GOS-3, w proporcji ilościowej 2 : 1. Z badań Boon i wsp. [4] wynika, że preparaty  $\beta$ -galaktozydazy z *Bacillus cirulans*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* syntetyzują różne ilości i rodzaje GOS, np. enzymy z *Kluyveromyces* spp. syntetyzują głównie trioligosacharydy.

Najkorzystniejszą zawartość GOS (% udziału w sacharydach ogółem) uzyskano w procesie prowadzonym w roztworze permeatu o 10 % zawartości laktozy z zastosowaniem preparatu Ha-Lactase – 13,7 % (rys. 3 i 4). Wyjątkowo w reakcji z użyciem tego preparatu enzymatycznego korzystną zawartość GOS uzyskano po 10 min reakcji, gdy stopień hydrolizy laktozy wynosił 43 %, a wydajność syntezy monosacharydów wynosiła 50 %. Po zastosowaniu immobilizowanej  $\beta$ -galaktozydazy z *Penicillium*



*expansum* F3 w 38 % roztworze laktozy dopiero po 60 h reakcji uzyskano 28,7 % GOS [16].

Zheng i wsp. [31] wykazali natomiast, że wydajność syntezy GOS katalizowana przez  $\beta$ -galaktozydazę z *Aspergillus candidus* CGMCC3.2919 jest tym większa, im wyższe jest początkowe stężenie laktozy w mieszaninie reakcyjnej. Zastosowanie biomasy *Bifidocaterium bifidum* NCIMB 41171, jako źródła  $\beta$ -galaktozydazy, umożliwiło uzyskanie 20 % GOS w ogólnej zawartości sacharydów, gdy stężenie początkowe laktozy wynosiło aż 50 % [28]. Warunki tego procesu zostały następnie udoskonalone, co umożliwiło zwiększenie zawartości GOS do 36 – 43 % [9].

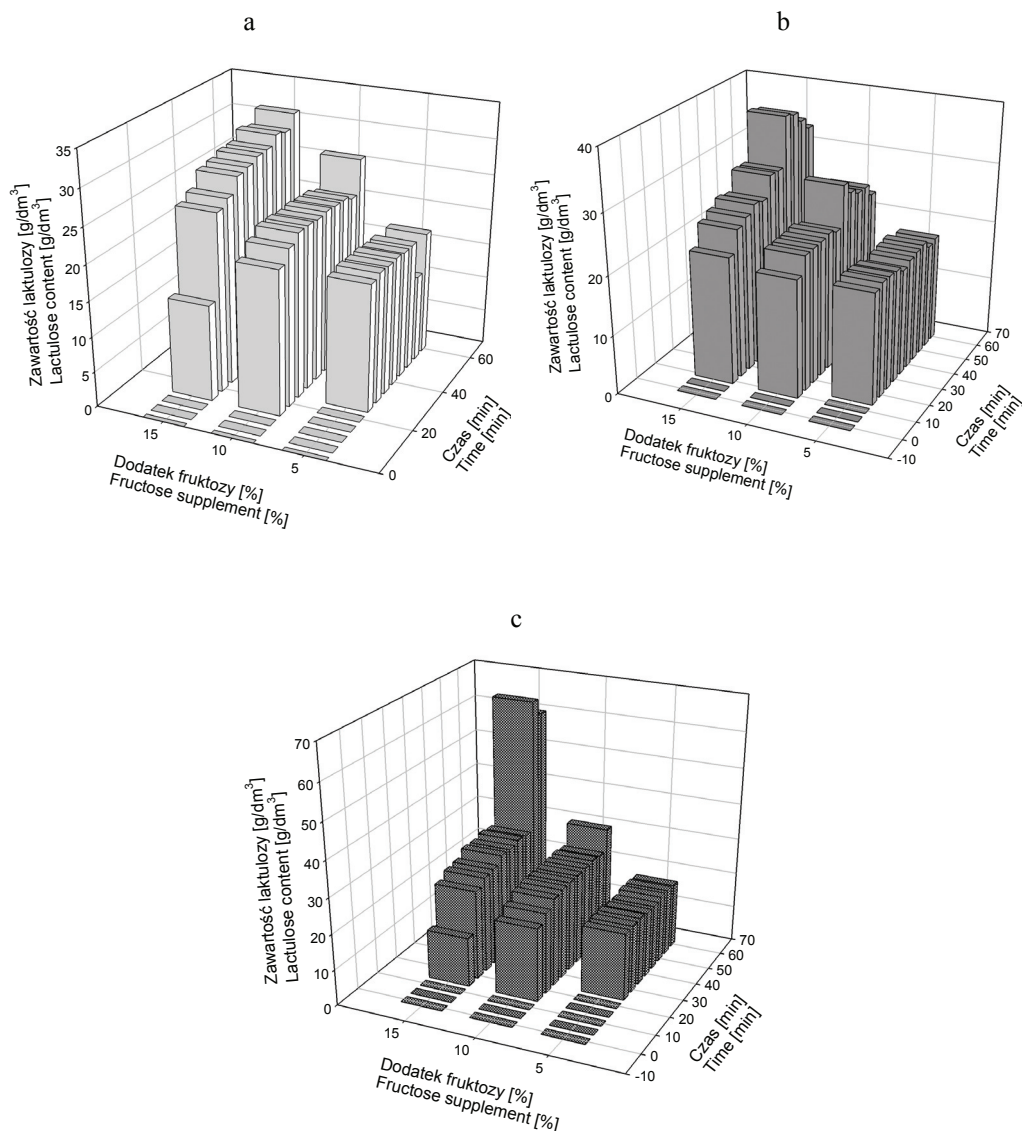


Rys. 4. Kinetyka syntezy GOS w reakcji katalizowanej przez enzymy w 10 % roztworze laktozy z permeatu po ultrafiltracji serwatki.

Fig. 4. Kinetics of GOS synthesis in the reaction catalyzed by enzymes in a 10 % solution of lactose prepared from permeate upon the ultrafiltration of whey.

Z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność sacharydów w temp. 40 °C skład mieszaniny reakcyjnej podczas syntezy laktulozy był następujący: 20 % laktozy i od 5 do 15 % fruktozy. W badanych preparatach enzymatycznych nie stwierdzono aktywności izomerazy glukozy (EC 5.3.1.5), dlatego do syntezy laktulozy konieczny był dodatek fruktozy. Laktuloza może być syntetyzowana przez  $\beta$ -galaktozydazę w roztworze zawierającym laktozę i fruktozę lub w reakcji z użyciem galaktozy i fruktozy. Przeprowadzono próby syntezy laktulozy w 15 % roztworze fruktozy z dodatkiem 5, 10 lub 15 % galaktozy w temp. 40 °C i pH 6,5. Analiza chromatograficzna próbek pobieranych co 10 min wykazała, że  $\beta$ -galaktozydaza z *Kluyveromyces lactis* nie syntetyzuje laktulozy bezpośrednio z produktów jej hydrolizy.





Rys. 5. Wpływ wielkości dodatku fruktozy do roztworu permeatu serwatki na syntezę laktulozy w reakcji katalizowanej przez preparaty enzymatyczne: a) Maxilact, b) Lactozym, c) Ha-Lactase.

Fig. 5. Effect of the amount of fructose added to whey permeate solution on the synthesis of lactulose in the reaction catalyzed by: a) Maxilact, b) Lactozym, c) Ha-Lactase.

Wykazano jednocześnie, że nie ma zależności pomiędzy aktywnością hydrolytyczną analizowanych preparatów  $\beta$ -galaktozydazy wobec laktulozy i aktywnością transgalaktozylacyjną, której wynikiem może być np. synteza laktulozy. Wysoką aktywność hydrolytyczną w stosunku do laktulozy wykazywał preparat Maxilact, nato-

miast korzystne jej stężenie uzyskano w reakcji katalizowanej przez preparat  $\beta$ -galaktozydazy, Ha-Lactase (stężenie początkowe laktozy i fruktozy, odpowiednio 20 i 15 %).

Stopień hydrolizy laktozy w reakcjach syntezy laktulozy wynosił od 80 do ponad 99 %. Korzystną zawartość laktulozy, po 40 - 60 min reakcji, uzyskano w roztworze permeatu po ultrafiltracji serwatki, z największym, 15 % dodatkiem fruktozy, w reakcji katalizowanej przez Maxilact – 31,9 g/dm<sup>3</sup> (rys. 5a); Lactozym – 37,9 g/dm<sup>3</sup> (rys. 5b); Ha-Lactase – 65,5 g/dm<sup>3</sup> (rys. 5c). Podobne stężenie laktulozy (50 g/l) uzyskano po 6 h reakcji katalizowanej przez  $\beta$ -galaktozydazę z *Sulfolobus solfataricus* [12].

W skład mieszaniny sacharydów po reakcji syntezy laktulozy wchodziły galakto-oligosacharydy (GOS) (~11 %), allolaktoza (~7 %), glukoza, galaktoza, fruktoza i co ważne tylko śladowe ilości laktozy. Wymagane jest jednak przeprowadzenie analizy spektrometrycznej, NMR, w celu potwierdzenia obecności allolaktozy w mieszaninie reakcyjnej. Dodatek fruktozy nie wpływał znacząco na zawartość i stopień polimeryzacji GOS otrzymywanych w wyniku reakcji transgalaktozylacji. Podobnie, jak po reakcji w roztworze laktozy z permeatu serwatki, głównym produktem był galaktooligosacharyd o stopniu polimeryzacji wynoszącym 2 (GOS-2).

Niewiele jest dostępnych informacji na temat enzymatycznej syntezy laktulozy, np. Mayer i wsp. [19] wskazali, że dodatek fruktozy w dawce 0,1–1,5 mol/l zwiększa aktywność badanego enzymu w kierunku syntezy laktulozy, a strukturę chemiczną produktu potwierdzono w badaniu spektroskopii <sup>13</sup>C NMR. Zastosowanie permeabilizowanych komórek *Kluyveromyces lactis* umożliwiło uzyskanie około 20 g/dm<sup>3</sup> laktulozy po 3 h reakcji (40 % laktoza, 20 % fruktoza, temp. 60 °C), a współczynnik produktywności wynosił 6,8 g/l × h [15].

## Wnioski

1. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają technologiczne możliwości sterowania enzymatyczną transgalaktozylacją laktozy w roztworach permeatu po ultrafiltracji serwatki w celu poprawy wydajności reakcji syntezy GOS i laktulozy.
2. Wykazano, że o wydajności procesu decyduje dobór preparatu  $\beta$ -galaktozydazy, stężenie laktozy, proporcja laktozy i fruktozy w mieszaninie reakcyjnej.
3. Efektem przeprowadzonych badań jest propozycja technologiczna produkcji koncentratów GOS i laktulozy z wykorzystaniem jako źródła laktozy permeatu po ultrafiltracji mleka lub serwatki. Otrzymane koncentraty GOS i laktulozy można stosować jako dodatki prebiotyczne w produkcji prozdrowotnej żywności (wzbogacania produktów mleczarskich, owocowo-warzywnych, cukierniczych i piekarskich), pasz lub preparatów farmaceutycznych.

### Literatura

- [1] Aider M., de Halleux D.: Isomerization of lactose and lactulose production: review. Trends Food Sci. Technol., 2007, **18**, 356-364.
- [2] Als-Nielsen B., Gluud L.L., Gluud C.: Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: Systematic review of randomized trials. Br. Med. J., 2004, **328**, 1046-1050.
- [3] Bednarski W., Kulikowska A.: Influence of two-phase system composition on biocatalytic properties of  $\beta$ -galactosidase preparations. Chem. Papers, 2007, **61**, 364 - 369.
- [4] Boon M.A., Janssen A.E.M., van t Riet K.: Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. Enzyme Microb. Technol., 2000, **26**, 271-281.
- [5] Cheng C.-C., Yu M.-C., Cheng T.-C., Sheu D.-C., Duan K.-J., Tai W.-L.: Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol. Lett., 2006, **28**, 793-797.
- [6] Curda L., Rudolfová J., Stetina J., Dryák B.: Dried buttermilk containing galactooligosaccharides - process layout and its verification. J. Food Eng., 2006, **77**, 468-471.
- [7] Elliott A.J., Datta N., Amenu B., Deeth H.C.: Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. J. Dairy Res., 2005, **72**, 442.
- [8] Gänzle M.G., Haase G., Jelen P.: Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. Int. Dairy J., 2008, **18**, 685-694.
- [9] Goulas A., Tzortzis G., Gibson G.R.: Development of a process for the production and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. Int. Dairy J., 2007, **17**, 648-656.
- [10] Hsu C.A., Lee S.L., Chou C.C.: Enzymatic production of galactooligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. J. Agric. Food Chem., 2007, **55**, 2225-2230.
- [11] Karczmarewicz E., Skorupa E., Lorenc R.S.: Wpływ probiotyków i prebiotyków na gospodarkę wapniowo-fosforanową i metabolizm kostny. Pediatria Współczesna. Gastroenterologia, hepatologia i żywienie dziecka, 2002, **4**, 63-69.
- [12] Kim Y.-S., Park C.-S., Oh D.-K.: Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. Enzyme Microb. Technol., 2006, **39**, 903-908.
- [13] Kowalewska-Piontas J., Bednarski W.: The attempts to intensity synthesis of galactooligosaccharides in the process of enzymatic lactose hydrolysis. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2001, **51**, 43-46.
- [14] Kowalewska-Piontas J., Demczuk A., Bednarski W., Amarowicz R.: A comparative study on galactooligosaccharide synthesis by selected  $\beta$ -galactosidase preparations. Gent, Belgium, 2003,
- [15] Lee Y.J., Kim C.S., Oh D.K.: Lactulose production by  $\beta$ -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, **64**, 787-793.
- [16] Li Z.-Y., Xiao M., Lu L., Li Y.: Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. Process Biochem., 2008, **43**, 896-899.
- [17] Maischberger T., Nguyen T.-H., Sukyai P., Kittl R., Riva S., Ludwig R., Haltrich D.: Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. Carbohydr. Res., 2008, **343**, 2140-2147.
- [18] Makowski K., Białkowska A., Szczesna-Antczak M., Kalinowska H., Kur J., Cieslinski H., Turkiewicz M.: Immobilized preparation of cold-adapted and halotolerant Antarctic  $\beta$ -galactosidase as a highly stable catalyst in lactose hydrolysis. FEMS Microbiol. Ecol., 2007, **59**, 535-542.
- [19] Mayer J., Conrad J., Klaiber I., Lutz-Wahl S., Beifuss U., Fischer L.: Enzymatic production and complete nuclear magnetic resonance assignment of the sugar lactulose. J. Agric. Food Chem., 2004, **52**, 6983-6990.

- [20] Mladenoska I., Winkelhausen E., Kuzmanova S.: Transgalactosylation/hydrolysis ratios of various  $\beta$ -galactosidases catalyzing alkyl- $\beta$ -galactoside synthesis in single-phased alcohol media. *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, **46**, 311-316.
- [21] Mussatto S.I., Mancilha I.M.: Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.*, 2007, **68**, 587-597.
- [22] Pessela B.C.C., Dellamora-Ortiz G., Betancor L., Fuentes M., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R.: Modulation of the catalytic properties of multimeric  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, **40**, 310-315.
- [23] Rousseau V., Lepargneur J.P., Roques C., Remaud-Simeon M., Paul F.: Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe*, 2005, **11**, 145-153.
- [24] Ryżko J. Zastosowanie probiotyków i prebiotyków w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit oraz zaburzeń czynnościowych jelita grubego. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, hepatologia i żywienie dziecka*, 2002, **4**, 55-60.
- [25] Sako T., Matsumoto K., Tanaka R.: Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 69-80.
- [26] Schaafsma G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 458-465.
- [27] Splechna B., Nguyen T., Steinbock M., Kulbe K.D., Lorenz W., Haltrich D.: Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 4999-5006.
- [28] Tzortzis G., Goulas A.K., Gibson G.R.: Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **68**, 412-416.
- [29] Withers S.G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr. Polym.*, 2001, **44**, 325-337.
- [30] Woudenberg-van Oosterom M., van Belle H.J.A., van Rantwijk F., Sheldon R.A.: Immobilised  $\beta$ -galactosidases and their use in galactoside synthesis. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 1998, **134**, 267-274.
- [31] Zheng P., Yu H., Sun Z., Ni Y., Zhang W., Fan Y., Xu Y.: Production of galacto-oligosaccharides by immobilized recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus candidus*. *Biotechnol. J.*, 2006, **1**, 1464-1470.

#### ENZYMATIC SYNTHESIS OF GALACTOOLIGOSACCHARIDES AND LACTULOSE IN WHEY-PERMEATE AFTER THE ULTRAFILTRATION OF WHEY

##### S u m m a r y

The results are presented of a research into technological possibilities of controlling the transgalactosylation process of lactose, catalyzed by the commercially available  $\beta$ -galactosidases, in a permeate obtained after the ultrafiltration of whey, in order to improve the efficiency of GOS and/or of lactulose synthesis. It was proved that the selected  $\beta$ -galactosidase and the substrate concentration decided on the efficiency of synthesis, and, in the case of the synthesis of lactulose, the ratio of lactose and fructose amounts as added to the reaction mixture. The efficiency of GOS synthesis and, first of all, of lactulose (65 % m/V in total saccharides) is found acceptable. A favourable content of GOS, i.e. 13.7 %, in saccharides was recorded after the process run in a solution of permeate with 10 % (m/V) of lactose using Ha-Lactase to catalyze the reaction. Based on the research conducted, a special technology of GOS and/or lactulose

synthesis is suggested with a permeate after the ultrafiltration of milk or whey applied (as a source of lactose). The obtained concentrates of GOS can be applied as a source of prebiotics in the production of health-promoting food, feedstuffs or pharmaceuticals. The postulated technology provides an opportunity for attractive, waste-free management of permeates after the ultrafiltration of milk or whey.

The subsequent investigations in this field will address experiments aiming at evaluating the conditions of continuous synthesis of GOS and/or lactulose with the use of immobilized enzymes.

**Key words:**  $\beta$ -galactosidase, whey-permeate, transgalactosylation, galactooligosaccharides (GOS), lactulose 