

# UPORABA $\beta$ -GALAKTOZIDAZE NA PODROČJU ŽIVILSTVA IN PREHRANE

Nika ŽIBRAT<sup>1,2</sup>, Mihaela SKRT<sup>3</sup>, Polona JAMNIK<sup>3</sup>

Received May 21, 2017; accepted September 23, 2017.  
Delo je prispelo 21. maja 2017, sprejeto 23. septembra 2017.

## *Uporaba $\beta$ -galaktozidaze na področju živilstva in prehrane*

$\beta$ -galaktozidaza je encim s hidrolitično in transgalaktozilacijsko aktivnostjo. Vrsta aktivnosti je odvisna od izvora encima. V industriji uporabljene  $\beta$ -galaktozidaze so pridobljene z rekombinantno produkcijo iz nitastih gliv *Aspergillus* sp. in kvasovk *Kluyveromyces* sp. V zadnjem času se vedno bolj preučujejo  $\beta$ -galaktozidaze, ki optimalno delujejo pri nizkih ali visokih temperaturah. V industrijskih procesih se  $\beta$ -galaktozidaza uporablja v obliki prostega encima ali v imobilizirani obliki. Imobilizacija pogosto ponuja večjo stabilnost encima, možnost ponovne uporabe ter znižanje stroškov.  $\beta$ -galaktozidaza se pretežno uporablja na področju živilstva in prehrane, v zadnjem času pa ima znatno vlogo tudi v medicini. Hidrolitična aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze se že dolgo izkorišča za zmanjšanje vsebnosti laktoze v mleku, medtem ko z reakcijami transgalaktozilacije iz laktoze lahko sintetiziramo različne produkte, kot so galaktooligosaharidi, laktosaharozo in drugi. Prav slednji imajo velik potencial v živilski industriji zaradi pridobivanja izdelkov z zmanjšano vsebnostjo laktoze in izboljšanja prehranske vrednosti živil s proizvodnjo galaktooligosaharidov. Kljub temu je potrebno boljše razumeti reakcijske mehanizme kot tudi optimizirati procese, da bo uporaba encima za ta namen dosegla industrijsko raven.

**Ključne besede:** prehrana ljudi; živilska industrija; živilstvo; encimi; beta-galaktozidaza

## *Potential application of $\beta$ -galactosidase in food science and nutrition*

$\beta$ -galactosidase is an enzyme with hydrolytic and transgalactosylation activity. The origin of the enzyme dictates the balance between both activities. Industrially used  $\beta$ -galactosidases are obtained with recombinant production from filamentous fungi *Aspergillus* sp. and yeasts *Kluyveromyces* sp. Recently thermostable  $\beta$ -galactosidases have been subject of many research. The enzyme can be industrially used in free or immobilized form. Immobilization often provides better stability, reusability and lower expenses. Application of  $\beta$ -galactosidase is most common in food processing and nutrition, it is also used in medicine and ecology. Hydrolytic activity of the enzyme has long been used for reducing lactose content in milk, while transgalactosylitic activity is used for synthesis of products such as galactooligosaccharides, lactosucrose and others. The latter have a great potential in food industry for obtaining products with reduced lactose content and increasing of nutritional value by adding dietetic fibers such as galactooligosaccharides. Despite the potential it is vital that reaction mechanisms become better understood and optimization is in place in order to reach the usability of this enzyme at industrial level.

**Key words:** human nutrition; food industry; enzymes; beta-galactosidase

1 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Slovenija

2 Korespondenčni avtor, e-naslov: nikazibrat@gmail.com

3 Isti naslov kot: 1

## 1 UVOD

$\beta$ -galaktozidaza (EC 3.2.1.23) je encim, ki ima hidrolitično kot tudi transgalaktozilacijsko aktivnost. Hidrolizira  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidno vez v  $\beta$ -D-galaktozidih, pri tem pa se odcepi  $\beta$ -D-galaktoza. Pri transgalaktozilaciji se glikozilna skupina prenese na D-galaktozno enoto laktoze (Obed Otieno, 2010). Hidrolitična in transgalaktozilacijska aktivnost je v veliki meri odvisna od izvora encima in koncentracije galaktoznega donorja in akceptorja.  $\beta$ -galaktozidaze iz mikroorganizmov vrste *Aspergillus niger* in *Bacillus circulans* imajo visoko transgalaktozilacijsko aktivnost, medtem ko tiste iz rodu *Kluyveromyces* izražajo visoko hidrolitično, a nižjo transgalaktozilacijsko aktivnost (Guerrero in sod., 2015). V zadnjem času so vedno bolj proučevane in priljubljene za uporabo v industriji  $\beta$ -galaktozidaze, ki optimalno delujejo pri nizkih ali visokih temperaturah (Oliveira, Guimarães in Domingues, 2011). Termostabilne  $\beta$ -galaktozidaze so pridobljene iz organizmov vrst *Aspergillus niger*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pyrococcus woesei*, *Thermus* sp. in so stabilne pri temperaturah od 35 do 80 °C.  $\beta$ -galaktozidaze iz psihrofilnih organizmov, kot so *Arthrobacter psychrolactophilus* in *Pseudoaltermonas haloplanktis*, so stabilne v temperaturnem območju od 0 do 25 °C (Panesar in sod., 2006; Sheik in Gunasekaran, 2010; Husain, 2010).

## 2 VIRI $\beta$ -GALAKTOZIDAZE

$\beta$ -galaktozidaza je lahko pridobljena iz mnogih virov, kot so mikroorganizmi, rastline in živali. Lastnosti encima se glede na vir med seboj razlikujejo. Mikroorganizmi imajo prednost pri industrijski uporabi, saj omogočajo hitro namnoževanje, lažje rokovanje ter visoke izkoristke.  $\beta$ -galaktozidaze iz rastlinskih in živalskih virov imajo majhno komercialno vrednost (Panesar in sod., 2010). Encim je tako izoliran iz mikroorganizmov vrst *Aspergillus niger*, *Bacillus megaterium*, *Beijerinckia indica*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterobacter cloacae*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus reuteri*, *Penicillium expansum* in uporabljen za produkcijo galaktoze, glukoze, galakto-oligosaharidov in heteropolisaharidov. Najbolj pogoste v industriji uporabljene  $\beta$ -galaktozidaze so pridobljene z rekombinantno produkcijo iz nitastih gliv *Aspergillus* spp. in kvasovk *Kluyveromyces* spp. (Zadow, 1984; Siso, 1996; Panesar in sod., 2006; Husain, 2010). Glavni razlog za to sta sprejemljiva produktivnost in donos. Prav tako imajo produkti, pridobljeni iz omenjenih mikroorganizmov, status GRAS – ang. generally recognised as safe, kar pomeni, da so varni za uživanje, kar je nujno za aplikacije na področju hrane (Siso, 1996; Panesar in sod., 2006;

Kosseva in sod., 2009). Pri nitasti glivi *Aspergillus* spp. se  $\beta$ -galaktozidaza proizvaja ekstracelularno. Encim ima optimalen pH v kislem območju (2,5–5,4) in visoko optimalno temperaturo, kar omogoča njegovo uporabo pri temperaturah do 50 °C (Zadow, 1984; Panesar in sod., 2006). Encim se uporablja za hidrolizo kisle sirotke, ki je stranski produkt predelave mleka v sveže in mehke sire (Yang in Silva, 1995). Nasprotno pa kvasovka *Kluyveromyces* spp. proizvaja intracelularni encim. Substrat laktoza se najprej s pomočjo permeaze prenese v notranjost celice, kjer jo encim hidrolizira do glukoze in galaktoze (Guimarães in sod., 2010). Encim ima optimalen pH delovanja blizu nevtralnemu (6,0–7,0) ter se tako lahko uporablja predvsem pri hidrolizi mleka in sladke sirotke, ki nastane pri predelavi mleka v trde sire (Zadow, 1984; Yang in Silva, 1995; Panesar in sod., 2006). Ker se encim proizvaja intracelularno, je za njegovo pridobivanje potrebna kemijska ali mehanska obdelava celic (Panesar in sod., 2006). V zadnjem času preučujejo še  $\beta$ -galaktozidaze iz mikroorganizmov vrste *Aspergillus oryzae* (Duarte in sod., 2017; Guerrero in sod., 2017), *Streptococcus thermophilus* (Geiger in sod., 2016), *Kluyveromyces lactis* (Santibáñez in sod., 2016), *Lactobacillus helveticus* (Watson in sod., 2016), *Planococcus* sp. (Mahdian in sod., 2016), *Escherichia coli* (Duan in sod., 2017), *Bacillus circulans* (Duarte in sod., 2017), *Rahnella* sp. (Fan in sod., 2015), *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Shen in sod., 2016) ter *Teratosphaeria acidotherma* (Yamanda in sod., 2017).

## 3 NAČINI UPORABE ENCI MA

$\beta$ -galaktozidazo lahko uporabimo na dva načina: kot prost encim v raztopini ali kot imobiliziran encim (Gänzle in sod., 2008). Uporaba prostega encima je tehnično lažja, vendar bolj potratna in hkrati dražja, saj raztopljene encima ni mogoče ponovno uporabiti. To predstavlja glavno oviro pri njegovi uporabi v industrijskih procesih. Membranska tehnologija, ki temelji na ultrafiltraciji na membranah, ki niso permeabilne za  $\beta$ -galaktozidazo, je metoda, ki vzbuja zanimanje zaradi možnosti ponovne uporabe encima (Richmond in sod., 1981; Gosling in sod., 2010). Imobilizacijske tehnike za uporabo encima so sicer tehnično zahtevnejše, vendar zagotavljajo ponovno uporabo encima in možnost aplikacije v kontinuirnih procesih ter zagotavljajo večjo stabilnost encima. Prav tako lahko v bioprocseh uporabimo cele celice ter se tako izognemo višjim stroškom zaradi izolacije encima. Velika slabost uporabe imobiliziranih celic je slaba permeabilnost celične membrane za laktozo. Permeabilnost lahko povečamo z obdelavo celic s kemijskimi agensi, kot so detergenti ali topila (Panesar in sod., 2006).

### 3.1 IMOBILIZACIJA

Imobilizacija je vezava encima v/na medij, s čimer je encim ločen od reakcijske zmesi, hkrati pa je omogočen stik encima s substratom (Husain, 2010). Je izjemno koristen proces, ki se uporablja predvsem za industrijske aplikacije. Poviša lahko uporabnost encima, prav tako poveča njegovo stabilnost med shranjevanjem. Imobilizacija v/na ustrezen medij lahko stabilizira encim na spremembe temperature in pH. Imobiliziran encim lahko večkrat uporabimo, kar zmanjša stroške zaradi ponovnega pridobivanja in čiščenja encima (Wahba, 2016). Namesto izolacije encima lahko imobiliziramo celice, v katerih se encim nahaja. Pri tovrstni imobilizaciji so stroški manjši, ker ni potrebna izolacija, hkrati pa so nekateri encimi bolj stabilni, kadar so imobilizirani v svojem naravnem okolju (Genari, Passos in Passos, 2003; Krajewska, 2004). Znane so različne tehnike za imobilizacijo  $\beta$ -galaktozidaze, kot so ujetje znotraj nosilca (ang. entrapment), kapsulacija, adsorbcija, kovalentna vezava (križno povezovanje) z možnostjo kombinacije tehnik (Guerrero in sod., 2017). Izbira medija za imobilizacijo encima je zelo pomembna, saj je v določenih primerih potrebna predhodna aktivacija medija za uspešno imobilizacijo encima, posledica tega pa je lahko interakcija med medijem in encimom, ki privede do inaktivacije samega encima (Rueda in sod., 2016).

Ločba imobiliziranega encima od reakcijske mešanice je nujna zahteva za uporabo imobilizacijskih tehnik v živilski industriji (Elnashar, 2010; Zucca in Sanjust, 2014). Od uporabljenih materialov za imobilizacijo je zaradi ugodnih lastnosti, kot so biokompatibilnost, fiziološka inertnost, biorazgradljivost na neškodljive produkte, netoksičnost in odlična afiniteta do proteinov, zelo primeren hitozan (Krajewska, 2004). Hitozan je skupno ime za veliko skupino hitinov, deacetiliranih do različnih stopenj. Sestavljen je pretežno iz 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoznih enot, povezanih z  $\beta$ -1,4-vezjo (Strnad in sod., 2007). Komercialno se pridobiva z deacetilacijo hitina, polisaharida, ki se nahaja v lupinah rakov. Kapsulacijske sposobnosti hitozanskih podlag za imobilizacijo so lahko izboljšane z uporabo reagentov, kot so glutaraldehid, genipin in drugi (Cauch-Rodriguez in sod., 1996; Muzzarelli, 2009). Klein in sod. (2016) so imobilizirali  $\beta$ -galaktozidazo, pridobljeno iz nitastih gliv vrste *A. oryzae*, na hitozansko podlago z reagentom genipin in jo uporabili za pridobivanje galaktooligosaharidov. Optimalna vrednost pH encima se je z imobilizacijo premaknila v bolj kislo območje, s 4,5–5,0 pri prostem encimu na 4, prav tako pa je imobiliziran encim ohranil višjo aktivnost pri pH=3 v primerjavi s prostim encimom. Z uporabo genipina namesto glutaraldehida kot zamreževalnega reagenta se lahko izognemo škodljivi

vim učinkom uporabe slednjega ter zato razširimo prej omejeno uporabo hitozana v živilski industriji (Klein in sod., 2016). Dwevedi in Kayastha (2009) sta imobilizirala  $\beta$ -galaktozidazo iz graha (PsBGal) na zamrežen dekstran in hitozan. Pri PsBGal, imobilizirani na hitozan, ni bilo zaznati izgube aktivnosti v 40 dneh, medtem ko je PsBGal, imobilizirana na dekstranu, začela izgubljati aktivnost že po 10 dneh hranjenja pri 4 °C. Po 10 izpiranjih je bila izguba aktivnosti pri hitozan imobilizirani PsBGal zanemarljiva, medtem ko se je pri dekstran imobilizirani PsBGal aktivnost zmanjšala za 70 %. To kaže, da se encim močneje veže na hitozan kot na dekstran (Dwevedi in Kayastha, 2009). Duarte in sod. (2017) so na hitozan kovalentno imobilizirano  $\beta$ -galaktozidazo uporabili za bioproces sinteze prebiotika laktosaharoze. Imobilizacija je izboljšala stabilnost encima pri 50 °C za 260-krat. Z uporabo saharoze (300 g l<sup>-1</sup>), laktoze (300 g l<sup>-1</sup>) in hitozana (8,5 g l<sup>-1</sup>) je encim ohranil maksimalno aktivnost tudi po tridesetih ciklih uporabe (Duarte in sod., 2017).

Kishore in Kayastha (2012) sta  $\beta$ -galaktozidazo, izolirano iz čičerike (*C. arietinum*), imobilizirala na alikilamin. Optimalna vrednost pH se je premaknila v kislo območje. Optimalna temperatura se ni spremenila, vendar je encim pokazal boljšo temperaturno stabilnost v primerjavi s prostim encimom. Imobiliziran encim je po treh mesecih hranjenja v 25 mM fosfatnem pufru pri 4 °C ohranil več kot 80 % začetne aktivnosti, medtem ko je encim, hranjen v suhem okolju pri sobni temperaturi, ohranil 72 % začetne aktivnosti. Imobilizirana  $\beta$ -galaktozidaza je ohranila 82 % prvotne aktivnosti po 15-ih zaporednih šaržah uporabe (Kishore in Kayastha, 2012).

Wahba (2016) je kovalentno imobilizirala  $\beta$ -galaktozidazo iz nitastih gliv vrste *A. oryzae* na podlago iz kalcijevega pektinata, tretiranega s polietileniminom in glutaraldehidom. Po imobilizaciji  $\beta$ -galaktozidaze na omenjen nosilni material je encim pokazal premik optimalne temperature delovanja s 55 °C (Vera in sod., 2011) na 60 °C ter večjo toleranco na visoke temperature. Imobilizirana  $\beta$ -galaktozidaza je ohranila 80,2 % aktivnosti pri temperaturi 65 °C in 22,7 % pri temperaturi 70 °C, medtem ko je prosti encim ohranil 49,5 % in 9,8 % aktivnosti pri zgoraj navedenih temperaturah. Optimalni pH delovanja imobiliziranega encima je v širšem območju pH vrednosti pomaknjen k bolj kislim vrednostim (3,2–5,4) v primerjavi z optimalno pH vrednostjo delovanja samega izoliranega encima (5,3). Gel iz kalcijevega pektinata, tretiranega s polietileniminom in glutaraldehidom, je zaradi svoje mehanske stabilnosti in ugodnega vpliva na aktivnost encima primeren za industrijske aplikacije (Wahba, 2016). Huerta in sod. (2011) so imobilizirali  $\beta$ -galaktozidazo iz nitaste glive vrste *A. oryzae* na gliksil-agarozo, z namenom sinteze galaktooligosaharidov.

haridov (GOS) iz medija z visoko koncentracijo laktoze. Imobiliziran encim je pokazal odlično stabilnost ter izkoristek procesa, saj je po desetih 3-urnih šaržah 1 mg imobiliziranega encima sintetiziralo kar 7,9 g GOS, medtem ko je prost encim pri enakih pogojih sintetiziral le 2,9 g GOS. Učinkovitost encima se je z imobilizacijo povečala za 190 %, prav tako je encim po desetih šaržah ohranil 75 % začetne aktivnosti (Huerta in sod., 2011). Neri in sod. (2009) so za proizvodnjo galaktooligosaharidov imobilizirali na magnetni polisiloksan-polivinil alkohol (mPOS-PVA)  $\beta$ -galaktozidazo iz nitaste glive vrste *A. oryzae*. V 50 % (w/v) reakcijski zmesi pri pH 4,5 in temperaturi 40 °C je bil izkoristek 55 %. Maksimalna dosežena koncentracija GOS je bila 26 % glede na vsebnost skupnih sladkorjev, trisaharidi so predstavljali 81 % sintetiziranih GOS (Neri in sod., 2009).

### 3.2 UPORABNOST ENCIMA

$\beta$ -galaktozidaza je v živilski industriji najpogosteje uporabljena za pridobivanje laktozno hidroliziranih mlečnih izdelkov (Hsu, Yu in Chou, 2005; Heyman, 2006; Neri in sod., 2008). Transgalaktozilacijska aktivnost pa se izkorišča za pridobivanje prebiotičnih produktov, kot so galaktooligosaharidi, laktosaharoza, laktuloza, galaktoziltrehaloza in gal-sorbitol (Oliveira, Guimarães in Domingues, 2011).

$\beta$ -galaktozidaza je pomembna pri laktozni intoleranci, kjer zaužitje encima pomaga pri prebavi laktoze. Poleg mleka je glavni vir laktoze sirotka, ki nastane pri predelavi mleka v sir.  $\beta$ -galaktozidaza in njena hidrolitična aktivnost pri razgradnji laktoze je zato učinkovito sredstvo za zmanjševanje negativnega vpliva sirotke kot glavnega stranskega produkta proizvodnje sira na okolje, hkrati pa omogoča pretvorbo sirotke v široko uporabne produkte (Bailey in sod., 1982; Terrell in sod., 1984, Geiger in sod., 2016).

Kljub temu, da  $\beta$ -galaktozidazo zaradi njene hidrolitične aktivnosti tradicionalno uporabljamo v mlekarški industriji za pridobivanje mleka brez laktoze, je na tem področju še veliko možnosti za razvoj. Tukaj je pomembno omeniti  $\beta$ -galaktozidaze, ki so aktivne pri nizkih temperaturah (Song in sod., 2010) in se lahko uporabijo za hidrolizo laktoze v ohlajenem mleku, kot tudi termofilne, ki omogočajo hidrolizo laktoze sočasno s postopkom pasterizacije pri pridobivanju mleka z zmanjšano vsebnostjo laktoze (Oliveira in sod., 2011).

#### 3.2.1 HIDROLIZA LAKTOZE V MLEKU Z NAMENOM IZBOLJŠANJA TEHNOLOŠKIH IN PREHRANSKIH LASTNOSTI MLEKA

$\beta$ -galaktozidaza katalizira hidrolizo laktoze v dva monosaharida, glukozo in galaktozo.

Mleko s hidrolizirano laktozo ima številne prednosti: (1) hitrejša fermentacija, (2) večja sladkost mleka, (3) višja topnost glukoze in galaktoze v primerjavi z laktozo, (4) večja stabilnost mleka s hidrolizirano laktozo, (5) hitrejši padec pH v siru, proizvedenem iz mleka s hidrolizirano laktozo, ter posledično boljše senzorične lastnosti (Jokar in Karbassi, 2009). Hidroliza laktoze je zaradi povečanja sladkosti mleka v sladoledu in sladkih mlečnih nadevih lahko alternativa uporabi saharoze ali škrobnim sirupom (Zadow, 1984; Siso, 1996). Panesar in sod. (2007) so zmanjšali vsebnost laktoze v mleku z uporabo kvasovk vrste *K. marxianus*. Kvasovka je pri optimiziranih pogojih hidrolizirala 89 % laktoze v mleku (Panesar in sod., 2007). Jokar in Karbassi (2011) navajata, da se senzorične lastnosti navadnega mleka in mleka brez laktoze v večji meri ne razlikujejo.

Najpogosteje se za hidrolizo laktoze v mleku uporabljajo rekombinantne  $\beta$ -galaktozidaze. Uporaba encima iz psihrotrofnih bakterij, kot so *Pseudoaltermonas* (Ciešliński in sod., 2005) in *Lactobacillus acidophilus* (Pan in sod., 2010), izraženega v bakterijah vrste *E. coli*, je bila uspešna z 90-% hidrolizo laktoze v 28 urah pri 15 °C ter 73-% hidrolizo laktoze v 30 urah pri 10 °C (Ciešliński in sod., 2005; Pan in sod., 2010). Na hitinu imobilizirana  $\beta$ -galaktozidaza iz arhebakterij vrste *Pyrococcus woesei*, izražena v bakterijah vrste *E. coli*, je pokazala veliko aktivnost in termostabilnost pri 75 °C (Daabrowski in sod., 2000). Yuan in sod. (2008) so termostabilno  $\beta$ -galaktozidazo iz bakterij vrste *Alicyclobacillus acidocaldarius* izrazili v kvasovki rodu *Pichia*. Rekombinanten encim je hidroliziral 48 % laktoze v mleku v 60 minutah pri 65 °C. Stopnja hidrolize je bila mnogo višja v raztopni laktoze pri enakih pogojih v primerjavi z mlekom. To poraja vprašanje o uporabnosti  $\beta$ -galaktozidaze iz bakterije *A. acidocaldarius* na industrijski ravni ter o morebitnih inhibitornih učinkih drugih sestavin v mleku na njeno aktivnost (Yuan in sod., 2008). Rekombinantna  $\beta$ -galaktozidaza iz bakterije *Bacillus stearothermophilus* je pokazala visoko aktivnost pri temperaturah do 75 °C in stabilnost pri višjih temperaturah. Temperaturne lastnosti in delovanje pri nevtralnem pH kaže, da je encim idealen kandidat za aplikacije v proizvodnji mleka z zmanjšanim deležem laktoze z možnostjo uporabe med pasterizacijskimi postopki (Chen in sod., 2008). Chen in sod. (2009) so leto kasneje rekombinantno  $\beta$ -galaktozidazo iz *Bacillus stearothermophilus* imobilizirali na hitozan s Tris fosfinom (THP). Imobiliziran encim

je pokazal boljšo aktivnost, termostabilnost, sposobnost skladiščenja in ponovne uporabe v primerjavi s prostim encimom. Delež hidrolizirane laktoze je bil pri 70 °C v dveh urah 80 % (Chen in sod., 2009).

Jokar in Karbassi (2011) sta za proizvodnjo  $\beta$ -galaktozidaze uporabila bakterije vrste *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Sirotkin permeat sta uporabila kot gojišče za namnoževanje bakterij. Pri aktivnosti encima v mleku 0,418 U/ml je bila stopnja hidrolize 78 %, kar je bila optimalna aktivnost. Pri višji aktivnosti encima je mleko koaguliralo. Pri komercialni  $\beta$ -galaktozidazi z aktivnostjo 0,512 U ml<sup>-1</sup> je bila stopnja hidrolize laktoze 90 % (Jokar in Karbassi, 2011). Li in sod., (2015) pa poročajo o uporabi komercialnega encima, pridobljenega iz kvasovke rodu *Kluyveromyces*, za hidrolizo laktoze z namenom zmanjšanja vsebnosti skupnih sladkorjev v čokoladnem mleku.

### 3.2.2 $\beta$ -GALAKTOZIDAZA ZA LAJŠANJE SIMPTOMOV LAKTOZNE INTOLERANCE

Vsaj 65 % odrasle populacije na svetu ima zmanjšano sposobnost prebave laktoze. Laktozna intoleranca ali hipolaktazija je stanje, pri katerem ima posameznik zmanjšano sposobnost prebaviti laktozo zaradi zmanjšane količine encima  $\beta$ -galaktozidaze ali pomanjkanja le-tega. Hipolaktazija v otroštvu je posledica mutacije na *LCT* genu, ki je nosilec genskega zapisa za  $\beta$ -galaktozidazo. Hipolaktazija v odraslem življenju je posledica zmanjšane sinteze  $\beta$ -galaktozidaze v celicah tankega črevesja, enterocitih. Najpogostejša je v vzhodni Aziji, kjer za njo trpi kar 90 % prebivalcev. Prav tako je zelo pogosta v državah Zahodne Afrike, arabskih ter judovskih državah (Institute for Quality and Efficiency in Health Care, 2015). Imobilizirana ali prosta  $\beta$ -galaktozidaza z oralnim vnosom pred zaužitjem hrane lahko pomaga pri lajšanju težav pacientov z laktozno intoleranco. Težave predstavlja stabilnost obeh oblik encima po zaužitju, saj se lahko encim razgradi, preden doseže tanko črevo. Alternativa uporabi standardnih imobilizirajočih agensov je lahko uporaba prepustnega polimernega matriksa, kot je polisaharidni hidrogel z aktivno površino, ki omogoča poznejše sproščanje encima (Ahmadi in sod., 2015).

### 3.2.3 HIDROLIZA LAKTOZE V SIROTKI IN PROIZVODNJA ETANOLA

Sirotka je stranski produkt predelave mleka, ki nastane ob koagulaciji kazeinov pri proizvodnji sira.  $\beta$ -galaktozidaza in njena hidrolitična aktivnost pri razgradnji laktoze je zato učinkovito sredstvo za zmanjševanje

vanje negativnega vpliva sirotke, kot glavnega stranskega produkta proizvodnje sira, na okolje. Letno na globalni ravni proizvedemo več kot 160 milijonov ton sirotke, kar pomeni približno 6 milijonov ton laktoze (Guimarães, Teixeira in Domingues, 2010). Glavni komponenti sirotke, beljakovine in laktozo, lahko ločimo z ultrafiltracijo. Rezultat so sirotkine beljakovine in sirotkin permeat, ki lahko vsebuje kar 85 % laktoze v suhi snovi (Geiger in sod., 2016). S pomočjo  $\beta$ -galaktozidaze lahko sirotko predelamo v surovino s širšo uporabnostjo (Bailey in sod., 1982; Terrell in sod., 1984, Geiger in sod., 2016) in jo uporabimo kot cenen substrat za mikroorganizme, negativne na laktozo, ali kot medij, ki promovira produkcijo uporabnih produktov. Prav tako lahko rekombinantno  $\beta$ -galaktozidazo uporabimo pri bioremediaciji sirotke, vendar je raziskav na tem področju malo (Oliveira in sod., 2011). Uporaba laktoze iz sirotke za pridobivanje etanola se na komercialni ravni uporablja že vsaj od leta 1970 (Lyons in Cunningham, 1980; Guimaraes in sod., 2010). Fermentacija laktoze v sirotki direktno v etanol ni komercialno uspešna metoda, razlog so predvsem nizki donosi in majhna toleranca mikroorganizmov na alkohol (Coté in sod., 2004). Sevi kvasovk iz rodu *Kluyveromyces*, še posebej *K. marxianus*, so bili med prvimi mikroorganizmi, uporabljenimi za pridobivanje etanola iz sirotkine laktoze. Domnevno majhna ozmotska toleranca je vzrok za dolgotrajno fermentacijo in relativno majhno količino etanola 2,5–4,4 % (v/v), pridobljenega iz gojišča z nizko začetno koncentracijo laktoze (5,0 %). Zato kvasovka *Kluyveromyces* ni najbolj primerna za fermentacijo laktoze do etanola (Guimaraes in sod., 2010). Jin in sod. (2016) so uporabili kvasovko *S. cerevisiae* za produkcijo etanola v gojišču, ki je vsebovalo 25 % pšenice in sirotkin permeat. Sočasno so v mešanico pšenice in permeata dodali še  $\beta$ -galaktozidazo iz nitaste glive vrste *A. oryzae* in kvasovk vrste *K. lactis* z namenom hidrolize laktoze.  $\beta$ -galaktozidaza iz nitaste glive *A. oryzae* je hidrolizirala kar 75,5 % laktoze, medtem ko je bil pri kvasnem encimu izkoristek slabši, in sicer 13,7 %. Razlog za to je razlika v optimalni vrednosti pH obeh encimov, saj je optimalna vrednost pH za  $\beta$ -galaktozidazo iz nitaste glive *A. oryzae* 4,5 (Grosova in sod., 2008) veliko bližja vrednosti pH fermentacije (4), medtem ko je optimalni pH  $\beta$ -galaktozidaze iz kvasovke *K. lactis* že v nevtralnem območju 6,5–7,0 (Dagbagli in Goksungur, 2008).  $\beta$ -galaktozidaza iz nitaste glive vrste *A. oryzae* je zato primernejša za hidrolizo laktoze pri kislih pogojih fermentacije. Ugotovili so, da sirotkin permeat lahko uspešno nadomesti del pšenice kot substrata za fermentacijo do etanola (Jin in sod., 2016). Uporaba  $\beta$ -galaktozidaze iz nitastih gliv se tako v prehranski industriji priporoča za hidrolizo laktoze iz kisle sirotke (Panesar in sod., 2010). Divji sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*,

ki nimajo  $\beta$ -galaktozidaze, lahko proizvajajo etanol iz hidrolizirane sirotke, vendar gre za mutante, ki so odporni na katabolno represijo z glukozo in galaktozo (Bailey in sod., 1982; Terrell in sod., 1984). Domingues in sod. (2005) so s transformirano kvasovko *S. cerevisiae*, ki izraža  $\beta$ -galaktozidazo, dosegli koncentracijo etanola  $9 \text{ g l}^{-1}$  pri začetni koncentraciji laktoze  $50 \text{ g l}^{-1}$  in stopnji redčenja  $0,45 \text{ h}^{-1}$  (Domingues in sod., 2005).

$\beta$ -galaktozidaze iz kvasovk imajo običajno optimalen pH v kislem območju in so zato bolj primerne za hidrolizo laktoze v kisli sirotki. Rekombinantna  $\beta$ -galaktozidaza iz nitaste glive vrste *Aspergillus niger* je bila izražena v kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae* in uporabljena za hidrolizo laktoze v sirotkinem permeatu. V 20 urah pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  je bila dosežena 90-% bio-konverzija laktoze. Sočasno ob izločanju rekombinantne  $\beta$ -galaktozidaze iz celic *S. cerevisiae* je nastajal etanol (Domingues in sod., 2002).

### 3.2.4 PROIZVODNJA GALAKTOOLIGOSAHARIDOV (GOS) IN LAKTOSAHAROZE

Galaktooligosaharidi so ogljikovi hidrati, ki so sestavljeni iz 2–20 molekul galaktoze in 1 molekule glukoze. Spadajo med prebiotike. Po zaužitju potujejo po prebavnem traktu, kjer jih hidrolizirajo in fermentirajo črevesne bakterije (Delzenne, 2003). Raziskave kažejo, da blagodejno vplivajo na črevesno mikrobioto, saj spodbujajo proliferacijo koristnih bifidobakterij in laktobacilov v črevesju, kateri prispevajo k zdravju človeka. Danes se uporabljajo predvsem za prehrano novorojenčkov (Patel in Goyal, 2010; Sabater in sod., 2015). Raziskave kažejo, da bi se GOS lahko uporabljali za zdravljenje zaprtja (Hamilton-Miller, 2004).

Za transgalaktozilacijske reakcije navadno uporabljamo mikroorganizme vrst *Aspergillus oryzae* in *Bacillus circulans*, in sicer zaradi ugodnega razmerja med transgalaktozilacijsko in hidrolitično aktivnostjo (Guerro in sod., 2011; Urrutia in sod., 2013). Prav tako so v uporabi *Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium infantis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Alkalilactibacillus ikkese* in *Bacillus stearothermophilus*. Vsi, razen *A. ikkense* in *B. stearothermophilus*, so mezofilni mikroorganizmi (Oliveira in sod., 2011). Veliko novjših raziskav proučuje mikroorganizme, ki sintetizirajo  $\beta$ -galaktozidazo z izboljšanim izkoristkom reakcij za pridobivanje galaktooligosaharidov (Neri in sod., 2009), vendar je donos encimske sinteze GOS redko višji od 40 % (Córdova in sod., 2017). Srivastava in sod. (2015) so z uporabo  $\beta$ -galaktozidaze iz kvasovk vrste *Kluyveromyces marxianus* iz laktoze sintetizirali GOS s 36-% donosom. Produkt je vseboval tri- in tetra-oligosaharide. Li

in sod. (2009) so v kvasovkah vrste *S. cerevisiae* klonirali gen iz nitaste glive vrste *P. expansum* F3, ki kodira  $\beta$ -galaktozidazo. Encim se izraža na površini kvasnih celic. Tako transformirana kvasovka je uspešno porabljala laktozo za produkcijo GOS. Stranski produkti reakcije so bili glukoza in manjše količine galaktoze. Medtem ko je kvasovka glukozo uporabila kot vir ogljika, je galaktoza služila kot induktor za izražanje  $\beta$ -galaktozidaze. Nastanek manjših količin galaktoze je bil torej ključen za nadaljnji potek reakcij (Li in sod, 2009). González-Delgado in sod. (2016) so z optimizacijo parametrov, kot so pH, začetna koncentracija laktoze in reakcijski čas, želeli izboljšati sintezo tri- in tetra-GOS z  $\beta$ -galaktozidazo iz kvasovk vrste *Kluyveromyces lactis*. Pri aktivnosti encima  $5 \text{ U ml}^{-1}$ ,  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$  in začetni koncentraciji laktoze  $250 \text{ g l}^{-1}$  so ob reakcijskem času treh ur dosegli 12,2-% donos GOS. S pomočjo pH jim je uspelo spremeniti sestavo produkta, natančneje delež tri-GOS in tetra-GOS. Pri pH 6,0 so dosegli 10,9-% delež tri-GOS, pri pH 7,0 pa 1,4-% delež tetra-GOS. Predvidevajo, da je pH pomemben parameter pri razmerju transgalaktozilacijske in hidrolitične aktivnosti encima, s pomočjo spreminjanja tudi drugih parametrov pa je mogoče povečati sintezo zaželenih GOS (González-Delgado in sod., 2016). Geiger in sod. (2016) so uporabili  $\beta$ -galaktozidazo iz bakterij vrste *Streptococcus thermophilus*, izraženo v bakteriji *Lactobacillus plantarum*, za pretvorbo laktoze iz sirotke v GOS. Proces je potekal pri temperaturah  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Hidroliza laktoze je potekala hitreje pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  ter je bila končana po dveh urah, medtem ko je pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  potekala pet ur. Pri začetni koncentraciji laktoze  $50 \text{ g l}^{-1}$  je bil izkoristek pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  80 %. Z višjo začetno koncentracijo laktoze  $205 \text{ g l}^{-1}$  je bil izkoristek po šestih urah pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  in po devetih urah pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  kar 95 %. Rezultati raziskave nakazujejo, da je iz dveh kg laktoze ali treh kg sirotkinega permeata z uporabo približno 100 kU encima mogoče proizvesti 1 kg GOS (Geiger in sod., 2016).

Produkt transgalaktozilacijske aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze je tudi laktosaharoza, trisaharid s potencialom prebiotika. Sintetizirana je iz laktoze in saharoze s prenosom galaktozne enote z laktoze na molekulo saharoze (Diez-Municio in sod., 2014). Duarte in sod. (2017) so uporabili na hitozan imobilizirano  $\beta$ -galaktozidazo, pridobljeno iz bakterij vrste *B. circulans*, in preučili vpliv vrednosti pH in temperature na produkcijo laktosaharoze in ostalih oligosaharidov. Pri pH 7 in  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$  je bila sestava produkta sledeča:  $79 \text{ g l}^{-1}$  laktosaharoze,  $37 \text{ g l}^{-1}$  galaktooligosaharidov in  $250 \text{ g l}^{-1}$  skupnih oligosaharidov. Pri pH 5 in  $T = 46 \text{ }^\circ\text{C}$  pa so bile vrednosti 40, 62 in  $250 \text{ g l}^{-1}$ . Rezultati so pokazali in potrdili, da lahko s spremembo reakcijskih pogojev spremenimo profil sestave končnega produkta

Transgalaktozilacijske reakcije imajo velik potencial

za industrijske aplikacije na področju mlekarstva in živilstva nasploh. Zaradi pogosto slabega donosa GOS prihaja do večjega ostanka laktoze in monosaharidov, kot sta galaktoza in glukoza, ti pa zvišujejo energijsko vrednost ter znižujejo prebiotično vrednost živila (Crittenden in sod., 2002; Cheng in sod., 2006). Santibáñez in sod. (2016) navajajo primer uporabe kvasovk vrste *Kluyveromyces lactis* za povečanje čistosti GOS, kar bi lahko prispevalo k večji uporabnosti in komercialni vrednosti GOS produktov.  $\beta$ -galaktozidazo iz nitaste glive vrste *Aspergillus oryzae* so uporabili za sintezo galaktooligosaharidov in laktuloze pri različnih temperaturah in pH. Transgalaktozilacijska aktivnost se je povečala z višanjem temperature do 55 °C, pH med 2,5 in 5,5 pa ni imel večjega vpliva, medtem ko je transgalaktozilacijska aktivnost začela padati pri višjem pH. Visoko učinkovito transgalaktozilacijsko aktivnost za sintezo  $\beta(1\rightarrow3)$  oligosaharidov lahko pridobimo iz  $\beta$ -galaktozidaze iz govejih testisov, vendar pa je izolacija proteina iz živalskih tkiv dolgotrajna in draga (Schröder in sod., 2014).

#### 4 ZAKLJUČEK

Encim  $\beta$ -galaktozidaza je zelo uporaben v živilski industriji, saj lahko pozitivno vpliva na prehransko vrednost živil, tehnološke procese predelave živil in je učinkovito orodje za zmanjševanje negativnega vpliva omejenjene industrije na okolje. Rekombinantna produkcija in proteinski inženiring omogočata hitrejšo pridobivanje encimov z željenimi lastnostmi ter visokim donosom. Možna je uporaba različnih tehnik imobilizacije, s katerimi lahko podaljšamo življenjsko dobo in stabilnost encima pri različnih vrednostih pH in temperaturah ter izboljšamo izkoristek procesa uporabe le-tega. Nekaterih lastnosti  $\beta$ -galaktozidaze, kot je transgalaktozilacijska aktivnost, še ne izkoriščamo na industrijski ravni zaradi nizkega izkoristka procesa, slabše čistosti končnega produkta ali neponovljivosti procesa, vendar število raziskav na tem področju narašča. Boljše poznavanje reakcijskih mehanizmov ter optimizacija procesov lahko v prihodnosti pripomoreta k raznovrstnejšim produktom boljše kakovosti.  $\beta$ -galaktozidaze bodo nedvomno ostale orodje s širokim spektrom aplikacij, z rastočim trgom funkcionalne hrane pa bodo za živilsko industrijo postale še pomembnejše termostabilne  $\beta$ -galaktozidaze.

#### 5 VIRI

Bailey, R. B., Benitez, T., Woodward, A. (1982). *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to catabolite repression: use in

- cheese whey hydrolysate fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 631–639.
- Beccera, M., Prado, S. D., Siso, M. I., Cerdan, M. E. (2001). New secretory strategies for *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase. *Protein Engineering, Design and Selection*, 14, 379–386. <https://doi.org/10.1093/protein/14.5.379>
- Cauich-Rodriguez, J. V., Deb, S., Smith, R. J. (1996). Characterization of hydrogel blends of poly(vinyl pyrrolidone) and poly(vinyl alcohol-vinyl acetate). *Journal of Materials Science: Materials and Medicine*, 7(5), 269–272. <https://doi.org/10.1007/BF00058565>
- Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Yang, J., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H. P., Zhang, H. (2009). Immobilization of recombinant thermostable beta-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 92, 491–498. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1618>
- Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H. (2008). Production, purification and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 91, 1751–1758. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-617>
- Cheng, C., Yu, M., Cheng, T., Sheu, D., Duan, K., Tai, W. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 28(11), 793–797. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9002-1>
- Cieśliński, H., Kur, J., Bialkowska, A., Baran, I., Makowski, K., Turkiewicz, M. (2005). Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted beta-galactosidase from antarctic bacterium *Pseudoaltermonas* sp. 22b. *Protein Expression and Purification*, 39, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.09.002>
- Córdova, A., Astudillo, C., Santibáñez, L., Cassano, A., Ruby-Figueroa, R., Illanes, A. (2017). Purification of galacto-oligosaccharides (GOS) by three-stage serial nanofiltration units under critical transmembrane pressure conditions. *Chemical Engineering Research and Design*, 117, 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.chemd.2016.11.006>
- Coté, A., Brown, W. A., van Walsum, G. P. (2004). Hydrolysis of lactose in whey permeate for subsequent fermentation to ethanol. *Journal of Dairy Science*, 87, 1608–1620. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73315-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73315-9)
- Crittenden, R., Playne, M. (2002). Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 297–302. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0886-3>
- Daabrowski, S., Sobiewska, G., Maciuńska, J., Synowiecki, J., Kur, J. (2000). Cloning, expression, and purification of the His(6)-tagged thermostable beta-galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. *Protein Expression and Purification*, 19, 107–112. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1231>
- Dagbagli, S., Goksungur, Y. (2008). Optimization of  $\beta$ -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4). <https://doi.org/10.2225/vol11-issue4-fulltext-12>
- Delzenne, N. M., Kok, N. N. (2003). Oligosaccharides: state of the art. *British Journal of Nutrition*, 62, 177–182.

- <https://doi.org/10.1079/PNS2002225>
- Diez-Municio, M., Herrero, M., Olano, A., Moreno, F. J. (2014). Synthesis of novel bioactive lactose-derived oligosaccharides by microbial glycoside hydrolases. *Microbial Biotechnology*, 7(4), 315–331. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12124>
- Domingues, L., Lima, N., Teixeira, J. A. (2005). Lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. *Process Biochemistry*, 40, 1151–1154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.016>
- Domingues, L., Teixeira, J. A., Penttilä, M., Lima, N. (2002). Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting high levels of *Aspergillus niger* beta-galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 645–650. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0948-1>
- Duan, X., Shubing, H., Xuhui, Q., Zhengbiao, G., Jing, W. (2017). Optimal extracellular production of recombinant *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Process Biochemistry*, 53, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.008>
- Duarte, L. S., Schöffner, J. N., Lorenzoni, A. S. G., Rodrigues, R. C., Rodrigues, E., Hertz, P. H. (2017). A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized  $\beta$ -galactosidase. *Process Biochemistry*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>
- Dwevedi, A., Kayastha, A. M. (2009). Optimal immobilization of  $\beta$ -galactosidase from Pea (PsBGal) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresource Technology*, 100, 2667–2675. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.048>
- Elnashar, M., Yassin M. A., Moneim, A. E. A., Bary, E. M. A. (2010). Surprising Performance of Alginate Beads for the Release of Low-Molecular-Weight Drugs. *Journal of Applied Polymer Science*, 116(5), 3021–3026. <https://doi.org/10.1002/app.31836>
- Fan, Y., Hua, X., Feng, Q. S., Dong, J., Zhao, W., Jin, Z., Yang, R. (2015). Cloning, expression and structural stability of a cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from *Rahnella* sp. R3. *Protein Expression and Purification*, 115, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.07.001>
- Gänzle, M. G., Loponen, J., Gobetti, M. (2008). Proteolysis of sourdough fermentations: Mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.04.002>
- Geiger, B., Nguyen, H. M., Weing, S., Nguyen, H. A., Lorenz, C., Kittl, R., ... Nhuyen, T. H. (2016). From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.003>
- Genari, A. N., Passos F. V., Passos F. M. (2003). Configuration of a bioreactor for milk lactose hydrolysis. *Journal of Dairy Science*, 86, 2783–2789. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73875-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73875-2)
- González-Delgado, I., López, Muñoz, M. J., Morales, G., Segura, Y. (2016). Optimisation of the synthesis of high galactooligosaccharides (GOS) from lactose with  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *International Dairy Journal*, 61, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.007>
- Gosling, A., Stevens, G. W., Barber A. R., Kentish S. E., Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food chemistry*, 121(2), 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.063>
- Grossova, Z., Rosenberg, M., Rebroš, M. (2008). Perspectives and application of immobilised beta-galactosidase in food industry – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(1), 1–14.
- Guerrero, C., Vera, C., Conejeros, R., Illanes, A. (2015). Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 70, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
- Guerrero, C., Vera, C., Illanes, A. (2017). Synthesis of lactulose in batch and repeated-batch operation with immobilized  $\beta$ -galactosidase in different agarose functionalized supports. *Bioresource Technology*, 230, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.037>
- Guerrero, C., Vera, C., Plou, F., Illanes, A. (2011). Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial  $\beta$ -galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3–4), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.007>
- Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Bio-technology Advances*, 28, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>
- Hamilton-Miller, J. M. (2004). Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgraduate Medical Journal*, 80(946), 447–451. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2003.015339>
- Heyman, M. B. (2006). Lactose intolerance in infants, children and adolescents. *Pediatrics*, 118 (3), 1279–1286. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1721>
- Hsu, C. A., Yu, R. C., Chou, C. C. (2005). Production of beta-galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 104(2), 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.010>
- Huerta, L. M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 46, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.018>
- Husain, Q. (2010). Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30 (1), 41–62. <https://doi.org/10.3109/07388550903330497>
- Institute for Quality and Efficiency in Health Care. (2015). Lactose intolerance: Overview. IQWiG. Pridobljeno iz <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072452/>
- Jin, Y., Parashar, A., Mason, B., Bressler, D. C. (2016). Simultaneous hydrolysis and co-fermentation of whey lactose with wheat for ethanol production. *Bioresource Technology*, 221, 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.063>
- Jokar, A. in Karbassi, A. (2009). Determination of proper conditions for the production of crude beta-galactosidase using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11, 301–308.
- Jokar, A., Karbassi, A. (2011). In-house Production of lactose-



- hydrolysed milk by beta-galactosidase from *Bacillus bulgaricus*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 577–584.
- Kishore, D., Kayastha, A. M. (2012). Optimisation of immobilisation conditions for chich pea  $\beta$ -galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose. *Food chemistry*, 143, 1650–1657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.055>
- Klein, M. P., Hackenhaar, C. R., Lorenzoni, A. S. G., Rodrigues, R. C., Costa, T. M. H., Ninow, J. L., Hertz, P. F. (2016). Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application on food process: Support characterization and of  $\beta$ -D-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 137, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>
- Kosova, M. R., Panesar, P. S., Kaur, G., Kennedy, J. F. (2009). Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.09.005>
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin – and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.enzymtec.2003.12.013>
- Li, X. E., Lopetcharat, K., Qiu, Y., Drake, M. A. (2015). Sugar reduction of skim chocolate milk and viability of alternative sweetening through lactose hydrolysis. *Journal of Dairy Science*, 98, 1455–1466. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8490>
- Li, Y., Lu, L., Wang, H., Xu, X., Xiao, M. (2009). Cell surface engineering of a  $\beta$ -galactosidase for galactooligosaccharide synthesis. *Applied and environmental microbiology*, 75(18), 5938–5942. <https://doi.org/10.1128/AEM.00326-09>
- Lyons, T. P., Cunningham, J. D. (1980). Fuel alcohol from whey. *American Dairy Products Review*, 42(11), 42A–42E.
- Mahdian, S. M. A., Karimi, E., Tanipour, M. H., Parizadeh, S. M. R., Ghayour-Mobarhan, M., Bazaz, M. M., Mashkani, B. (2016). Expression of a functional cold active  $\beta$ -galactosidase from *Planococcus* sp-L4 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 125, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.008>
- Muzzarelli, A. A. R. (2009). *Carbohydrate polymers*, 77(1), 1–9.
- Neri, D. F. M., Balcao, V. M., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho, Jr L. B., Teixeira, J. A.. (2008). Immobilization of  $\beta$  galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications*, 4, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2008.05.022>
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Costa, R. S., Rocha, I. C. A. P., Ferreira, E. M. F. C., Torres, D. P. M., Rodrigues, R. D. M., ... Teixeira, J. A. (2009). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.068>
- Obed Otieno, D. (2010). Synthesis of  $\beta$ -galactooligosaccharides from lactose using microbial  $\beta$ -galactosidase. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 9, 471–482. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00121.x>
- Oliveira, C., Giumarães M.R. P., Domingues, L. (2011). Recombinant microbial systems for improved  $\beta$ -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29, 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.008>
- Pan, Q., Zhu, J., Liu, L., Chong, Y., Hu, F., Li, J. (2010). Functional identification of a putative beta-galactosidase gene in the special *lac* gene cluster of *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*, 60, 172–178. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9521-9>
- Panesar P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F. in Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 530–543. <https://doi.org/10.1002/jctb.1453>
- Panesar, P. S., Kumari, S., Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, 16 str. <https://doi.org/10.4061/2010/473137>
- Panesar, R., Panesar, P. S., Singh, R. S., Bera, M. B. (2007). Applicability of alginate entrapped yeast cells for the production of lactose-hydrolyzed milk. *Journal of Food Process Engineering*, 30(4), 472–484. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00127.x>
- Patel, S., Goyal, A. (2010). The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*, 2(2), 115–125. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0044-x>
- Richmond, M. L., Gray, J. I., Stine, C. M. (1981).  $\beta$  galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *Journal of Dairy Science*, 64, 1759–1771. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82764-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82764-6)
- Rueda, N., Dos Santos, C. S., Rodrigues, M. D., Albuquerque, T. L., Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R. (2016). Reversible immobilisation of lipases on acrylglutamic agarose beads: a mixed absorbtion that reinforces enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 128, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.002>
- Sabater, C., Prodanov, M., Olano, A., Corzo, N., Monrilla, A. (2015). Quantification of prebiotics in commercial infant formulas. *Food Chemistry*, 194, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.127>
- Santibáñez, L., Fernández-Arrojo, L., Guerrero, C., Plou, F. J., Illanes, A. (2016). Removal of lactose in crude galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.014>
- Schröder, S., Kröger, L., Mattes, R., Thiem, J. (2014). Transglycosylations employing recombinant  $\alpha$  and  $\beta$ -galactosidases and novel donor substrates. *Carbohydrate Research*, 403, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.05.005>
- Sheik, S. Asraf, Gunasekaran P. (2010). Current trends of  $\beta$ -galactosidase research and application. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. In A. Mendez-Villas (Ed), *Formatex Microbiology Series 2(1)*. (pp. 880–890).
- Shen, Q., Zhang, Y., Yang, R., Pan, S., Dong, J., Fan, Y., Han, L. (2016) Enhancement of isomerization activity and lactulose production of cellobiose 2-epimerase from *Caldicel-*

- lulosiruptor saccharolyticus*. *Food Chemistry*, 207, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.067>
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57, 1–11. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3)
- Siso, M.I.G., Ramil, E., Cerdan, M.E. and Picos, M.A.F. (1996). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microbial Technology*, 18, 585–595. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00151-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00151-4)
- Song C., Chi, Z., Li, J., Wang, X. (2010). Beta-galactosidase production by the psychotolerant yeast *Guehomyces pululans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 1025–1031. <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0427-5>
- Srivastava, A., Mishra, S., Chand, S. (2015). Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *New Biotechnology*, 32(4), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.04.004>
- Strnad, S., Šauperl, O., Fras, L., Jazbec, A. (2007). Hitozan – vsestransko uporaben biopolimer. *Tekstilec*, 50(10–12), 243–261.
- Terrell, S. L., Bernard, A., Bailey R. B. (1984). Ethanol from whey – continuous fermentation with a catabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 577–80.
- Urrutia, P., Rodrigues-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballestros, A., Wilson, L., Illanes, A., Plou, F. J. (2013). Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(5), 1081–1087. <https://doi.org/10.1021/jf304354u>
- Vera, C., Guerrero, C., Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research*, 346(6), 745–752. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.030>
- Wahba, M. I. (2016). Treated calcium pectinate beads for the covalent immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.044>
- Watson, A. L., Chiu, N. H. L. (2016). Fluorometric cell-based assay for  $\beta$ -galactosidase activity in probiotic gram-positive bacterial cells – *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Microbiological Methods*, 128, 58–60. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.030>
- Yamanda, M., Chiba, S., Endo, Y., Isobe, K. (2017). New alkalophilic  $\beta$ -galactosidase with high activity in alkaline pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(1), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.07.003>
- Yang, M., Silva, M. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science*, 78, 2541–2562. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76884-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76884-9)
- Yuan, T. Z., Yang, P. L., Wang, Y. R., Meng, K., Luo, H. Y., Zhang, W. (2008). Heterologous expression of a gene encoding a thermostable beta-galactosidase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnology Letters*, 30, 343–348. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9551-y>
- Zadow, J. G. (1984). Lactose: properties and uses. *Journal of Dairy Science*, 67, 2654–2679. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81625-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81625-2)
- Zucca, P., Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, 19, 14139–14194. <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>