

Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Latvia University of Life Sciences and Technologies

Pārtikas tehnoloģijas fakultāte
Faculty of Food Technology



Mg.sc.ing. Kristīne Majore 

**SŪKALU VALORIZĀCIJA LAKTOZES PĀRSTRĀDES
PRODUKTU IEGUVEI**

**VALORISATION OF WHEY FOR LACTOSE RECYCLING
PRODUCTS PRODUCTION**

Promocijas darba KOPSAVILKUMS
zinātnes doktora (**PhD**) zinātniskā grāda iegūšanai
pārtikas un dzērienu tehnoloģijās

SUMMARY

*of the Doctoral thesis for acquiring a Doctor of science (PhD) in
Food and Beverage Technologies*

Jelgava
2021

Promocijas darba vadītāja / *Scientific supervisor:*

LLU profesore *Dr.sc.ing.* Inga Ciproviča,

Darba recenzenti / *Official reviewers:*

Vadošā pētniece, asociētā profesore / *Leading researcher, associated professor*
Dr.sc.ing. Māra Dūma – Latvijas Lauksaimniecības universitāte / Latvia
University of Life Sciences and Technologies

Profesore / Professor *Dr. habil. Grazina Juodeikiene* – Kauņas Tehnoloģiju
universitāte (Lietuva) / Kaunas University of Technology (Lithuania)

Vadošais pētnieks / *Leading researcher* *Dr.biol. Armands Vīgants* – LU
Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts, Ogļhidrātu biokonversijas
laboratorija / *University of Latvia, Institute of Microbiology and Biotechnology,*
Carbohydrate bioconversion laboratory.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Lauksaimniecības universitātes
Pārtikas un dzērienu tehnoloģijas nozares promocijas padomes atklātajā sēdē
2021. gada 22. oktobrī plkst. 15:00 Pārtikas tehnoloģijas fakultātes 216.
auditorijā, Rīgas ielā 22a, Jelgavā.

*The defence of the doctoral thesis in an open session of the Promotion Board of
the Food and Beverage Technology of Latvia University of Life Sciences and
Technologies - will be held on 22th October 2021 at 15 PM in auditorium 216 at
Faculty of Food Technology of Latvia University of Life Sciences and
Technologies, 22a Rigas Street, Jelgava.*

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties LLU
Fundamentālajā bibliotēkā, Lielajā ielā, 2 Jelgavā un internetā (pieejams:
www.kopkatalogs.lv). Atsauksmes sūtīt Pārtikas un dzērienu tehnoloģijas
nozares promocijas padomes sekretārei, profesore *Dr.sc.ing. I. Beitānei* (Rīgas
iela 22a, Jelgava LV-3004, e-pasts: ilze.beitane@llu.lv).

The doctoral thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia
University of Life Sciences and Technologies, 2 Liela Street, Jelgava, and
www.kopkatalogs.lv References should be sent to professor *Dr.sc.ing. I.Beitane,*
the Secretary of the Promotion Board of the Food and Beverage Technology,
Faculty of Food Technology, 22a Rīgas street, Jelgava LV-3004, Latvia or e-
mail: ilze.beitane@llu.lv.

SATURS

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE	4
ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA	5
MATERIĀLI UN METODES	7
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	15
1. Kalcija, nātrija, kālija un magnija jonu ietekme uz β-galaktozidāzes aktivitāti	15
2. Komerčiālās β-galaktozidāzes stabilitātes izpēte kuņģa-zarnu trakta modeļvidē	17
3. Dehidratēta sūkalu ultrafiltrāta fizikālās īpašības	20
4. Glikozes izomerizācija sīrupa salduma palielināšanai.....	21
5. Sīrupu sensorā novērtēšana	24
SECINĀJUMI.....	30
LITERATŪRAS SARAKSTS	43

CONTENT

TOPICALITY OF THE RESEARCH	31
APPROBATION OF THE RESEARCH	33
MATERIALS AND METHODS	33
RESULTS AND DISCUSSION	35
1. The impact of calcium, sodium, potassium and magnesium ions on β-galactosidase activity	35
2. The study of β-galactosidase stability under gastric intestinal model <i>in vitro</i>	36
3. Physical properties of dehydrated whey permeate	38
4. Glucose isomerisation for increasing of syrup sweetness.....	38
5. The sensory evaluation of developed syrups	40
CONCLUSIONS.....	42
BIBLIOGRAPHY	43

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Arvien aktuālāka kļūst jaunu metožu un tehnoloģiju izmantošana pārtikas blakusproduktu pārstrādei funkcionālos produktos. Ir divu veidu sūkalas - siera un biezpiena, kuras zinātnieki pastāvīgi pēta, lai iegūtu jaunu informāciju un atziņas. Viena no sūkalu apstrādes tehnoloģijām ir biotehnoloģija, kurā ar β -galaktozidāzi ir iespējams hidrolizēt laktozi monosaharīdos. Šis ir pirmais solis glikozes-galaktozes sīrupa ieguvei. Praksē glikozes-galaktozes sīrupu ar sausnu 70% ražo no siera sūkalām.

Laktozes hidrolīzē iegūtā glikoze un galaktoze tiek uzskatītas par lielisku alternatīvu saharozei, jo radušies cukuri ir saldāki, tos var izmantot pārtikas un lauksaimniecības produktu ražošanai. Pēdējo divdesmit gadu laikā šis process ir motivējis zinātniekus veikt pētījumus un analizēt laktozes hidrolīzes priekšrocības (Das *et al.*, 2015).

Pastāv arī citas iespējas sīrupa salduma palielināšanai, pievienojot glikozes izomerāzi, kas pārvērš glikozi fruktozē. Ir svarīgi uzsvērt, ka hidrolīzes laikā veidojas arī galakto-oligosaharīdi, kas ir vērtīgas prebiotikas. Turklāt hidrolizējamam substrātam pievienojot noteiktu fruktozes daudzumu, var palielināt arī laktulozes saturu produktā. Laktuloze uzlabo galaprodukta vērtību, ir prebiotika un var labvēlīgi ietekmēt gremošanas procesus organismā.

Pētījumā iegūstamais sīrups būs lieliska alternatīva saldvielām un saldinātājiem, raksturoties ar funkcionālām īpašībām un mazāku enerģētisko vērtību.

Promocijas darba **mērķis**: pilnveidot laktozes hidrolīzes procesu glikozes-galaktozes un oligosaharīdu sīrupa iegūšanai.

Promocijas darba **hipotēze**: divpakāpju fermentācija palielina glikozes-galaktozes sīrupa salduma pakāpi.

Promocijas darba hipotēzi pierāda ar šādām tēzēm:

1. Katjonu klātbūtne ietekmē β -galaktozidāzes aktivitāti siera un biezpiena sūkalu ultrafiltrātā.
2. Sūkalu ķīmiskais sastāvs un kvalitātes rādītāji ietekmē laktozes fizikālās īpašības.
3. Enzimātiskās reakcijas būtiski ietekmē sīrupu funkcionālās un sensorās īpašības.

Pētījuma **objekti** – biezpiena un siera sūkalu ultrafiltrāts, glikozes izomerāze, komerciālās β -galaktozidāzes un glikozes-galaktozes sīrups.

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi **uzdevumi**:

1. Novērtēt katjonu ietekmi uz β -galaktozidāzes aktivitāti fermentējamā substrātā.
2. Izpētīt laktozes fizikālās īpašības, tās sekmīgai hidrolīzei.
3. Analizēt monosaharīdu satura izmaiņas laktozes hidrolīzē, variējot ar substrātu sausnu un pievienotā enzīma aktivitātes vienībām.
4. Izvērtēt glikozes izomerāzes izmantošanas iespējas glikozes-galaktozes

sīrupa salduma palielināšanai.

5. Novērtēt izstrādāto sīrupu sensorās īpašības.

Darba novitāte:

1. Laktozes hidrolīzes procesa likumsakarību izpēte galakto-oligosaharīdu, tostarp laktulozes veidošanā.
2. β-Galaktozidāzes un glikozes izomerāzes kombinācija glikozes-galaktozes sīrupa salduma palielināšanai.

Tautsaimnieciskā nozīme:

1. Īstenotie pētījumi ļauj iegūt sīrupu, kuru var izmantot saldvielu un saldinātāju aizstāšanai pārtikas rūpniecībā un funkcionālo produktu ieguvei.
2. Piedāvāts tehnoloģiskais risinājums laktozes hidrolīzei, vispusīgi izvērtējot laktozes fizikālās īpašības, fermentācijas parametrus un sūkalu sastāvu.

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

Pētījuma rezultāti publicēti 6 zinātniskajos izdevumos, kas indeksēti SCOPUS un Web of Science datu bāzēs.

1. Majore, K., Ciproviča, I. (2020) Optimisation of lactose hydrolysis by combining solids and β-galactosidase concentrations in whey permeates. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B Natural Exact and Applied Sciences*, 74, 4, p. 263-269. DOI: 10.2478/prolas-2020-0041
2. Žolnere, K., Ciproviča, I. (2019) The study of physical properties of spray dried whey and milk permeates lactose. *Agronomy Research*, 17, 2, p. 1501-1510. DOI: 10.15159/AR.19.054
3. Žolnere, K., Ciproviča, I. (2019) Lactose hydrolysis in different solids content whey and milk permeates. *13th Baltic Conference on Food Science and Technology, FOODBALT 2019 joined with 5th North and East European Congress on Food NEEFood 2019 "FOOD. NUTRITION. WELL-BEING"*, Conference proceeding, p. 35-39. DOI: 10.22616/FoodBalt.2019.011
4. Žolnere K., Ciproviča I., Ķirse A., Cinkmanis I. (2018) A study of commercial β-galactosidase stability under simulated in vitro gastric conditions. *Agronomy Research*, 16, 2, p. 1555-1562. DOI: 10.15159/AR.18.075
5. Žolnere K., Ciproviča I. (2017) The comparison of commercially available β-galactosidases for dairy industry: a review. *Research for Rural Development 2017, The Annual 23th International Scientific. Conference Proceeding*, Volume: 1, Latvia University of Agriculture, Jelgava, Latvia, p. 215-222. DOI: 10.22616/rrd.23.2017.032
6. Žolnere K., Liepiņš J., Ciproviča I. (2017) The impact of calcium ions on commercially available β-galactosidase. *11th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food science and technology in a changing*

world” *FOODBALT-2017*, Conference proceedings, p. 27 – 30. DOI: 10.22616/foodbalt.2017.017

Par zinātniskā darba rezultātiem ziņots 8 starptautiskās zinātniskās konferencēs Igaunijā, ASV, Latvijā, Čehijā un Itālijā.

1. Žolnere, K., Ciproviča, I. (2019) The study of physical properties of spray dried whey and milk permeates lactose. *The Biosystems Engineering conference*, Tartu, Estonia, 2019, May 8 – 10 (Oral presentation / Mutiskā prezentācija).
2. Žolnere, K., Ciproviča, I. (2019) Lactose hydrolysis in different solids content whey and milk permeates”. 13th Baltic conference on Food Science and Technology, *FOODBALT 2019* joined with 5th North and East European Congress on Food, *NEEFood 2019 “FOOD. NUTRITION. WELL-BEING”*, Jelgava, Latvia, 2019, May 2 – 3 (Oral presentation / Mutiskā prezentācija).
3. Žolnere, K., Ciproviča, I., Ķirse, A., Cinkmanis, I. (2018) A study of commercial β -galactosidase stability under simulated *in vitro* gastric conditions. *The Biosystems Engineering conference*, Tartu, Estonia, 2018, May 9 (Poster presentation / Stenda referāts)
4. Žolnere, K., Ciproviča, I. (2018) Optimization of bioprocesses for lactose recycling products. *CAFES Research Seminar Series*, San Luis Obispo, California, USA, 2018, May 10 (Oral presentation / Mutiskā prezentācija).
5. Žolnere, K., Ciproviča, I. (2018) The effect of whey salts on enzymatic lactose hydrolysis. *ICBFE 2018: 20th International Conference on Bioprocessing and Food Engineering*, Roma, Italy, 2018, March, 5 – 6 (Oral presentation / Mutiskā prezentācija).
6. Žolnere, K., Liepiņš, J., Ciproviča, I. (2017) Development of easy to use analytical method for determination of commercial β -galactosidase activity. *8th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis*, Praha, Czech Republic, 2017, November 7 – 8 (Poster presentation / Stenda referāts).
7. Žolnere, K., Ciproviča, I. (2017) The comparison of commercially available β -galactosidases for dairy industry: Review. 23rd Annual International Scientific Conference *“Research for Rural Development 2017”*, Jelgava, Latvia, 2017. May, 17 - 19 (Oral presentation / Mutiskā prezentācija).
8. Žolnere, K., Liepiņš, J., Ciproviča, I. (2017) The impact of calcium ions on commercially available β -galactosidase. 11th Baltic Conference on Food Science and Technology *“Food science and technology in a changing world” FOODBALT-2017*. Jelgava, Latvia, 2017, April 27 – 28 (Oral presentation / Mutiskā prezentācija).

Promocijas darba izstrāde līdzfinansēta:

Studiju laikā doktorante praktizējusies un īstenojusi pētnieciskā darba izstrādi Kalifornijas Politehniskās universitātes Piena inovācijas institūtā (ASV) ar Baltijas - Amerikas Brīvības fonda (BAFF) un Starptautiskās izglītības apmaiņas padomes (CIEE) piešķirtās stipendijas atbalstu.

Promocijas darba izstrāde veikta ar daļēju “Zinātniskās kapacitātes stiprināšana Latvijas Lauksaimniecības universitātē” projekta Nr. 3.2.-10/2017 / LLU / 27 “Bioprocesu optimizācija laktozes pārstrādes produktu ieguvei” atbalstu.

Promocijas darba izstrāde veikta ar daļēju “LLU pāreja uz jauno doktorantūras finansēšanas modeli” projekta Nr. 3.2.-10/90 atbalstu.

Research was supported by the research programmes:

During the PhD studies the author had an internship at the Dairy Innovation Institute California Polytechnic State University (USA), where the experimental work was done. Internship was provided by the Baltic – American Freedom Foundation (BAFF) and the Council on International Education Exchange (CIEE).

The study was partly financed by the LLU programme “Strengthening Research Capacity at the Latvia University of Agriculture” grant (Contract No. 3.2.-10/2017/LLU/27) “The optimization of bioprocesses for lactose recycling products”.

The study was partly financed by the doctoral studies grant “Transition to the new doctoral funding model at the Latvia University of Life Sciences and Technologies” (Contract No. 3.2.-10/90).



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

"Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU"

Baltic-American Freedom Foundation

MATERIĀLI UN METODES

Pētījuma laiks un vieta

Zinātniskais darbs izstrādāts laika posmā no 2016. gada novembrim līdz 2021. gada maijam Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģijas fakultātes Studiju un zinātnes centra laboratorijās; Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā, Ķīmijas fakultātē un Cietvielu fizikas institūtā; Kalifornijas Politehniskās universitātes Piena Inovāciju institūtā, “J.S. Hamilton Poland Sp. z o.o. testing laboratory” laboratorijā.

Materiālu raksturojums

Eksperimentos izmantotās siera un biezpiena sūkalas tika iegūtas no AS “Smiltenes piens” un AS “Tukuma piens”. 1. tabulā apkopots pētījumā lietoto sūkalu ultrafiltrātu sastāvs un pH.

1. tabula / Table 1

Biezpiena un siera sūkalu ultrafiltrāta sastāvs un pH / Composition and pH of sweet and acid whey permeates

Ultrafiltrāts / <i>Permeate</i>	Siera sūkalu / <i>Sweet whey</i>	Biezpiena sūkalu / <i>Acid whey</i>
Tauki, / <i>Fat</i> , %	0	0
Olbaltumvielas / <i>Proteins</i> , %	0.2±0.1	0.5±0.1
Laktoze / <i>Lactose</i> , %	3.8±0.1	4.2±0.2
Sausna/ <i>Total solids</i> , %	4.6±0.1	5.2±0.2
pH	6.1±0.1	4.6±0.1

Eksperimentu uzsākot, ultrafiltrāta sastāvu analizēja ar MilkoScan™ Mars (Foss Analytical, Dānija) un pH ar inoLab pH 7110 (WTW, Vācija).

Citi materiāli:

- imobilizētā glikozes izomerāze (iegūta no *Streptomyces murinus*) iegādāta no Sigma – Aldrich (Vācija). Enzīmam ir cilindriska forma (diametrs ir ap 0.6–0.8 mm un garums 1.4–1.8 mm). Pēc ražotāja norādēm, glikozes izomerāzes aktivitāte ir lielāka par 350 U g⁻¹, optimālais vides pH 7.5 un optimālā temperatūra 70 °C;
- fruktoze (Sigma-Aldrich, Vācija);
- glikoze - galaktozes sīrups (AS “Smiltenes piens”).

Laktozes hidrolīzei izmantoto komerciālo β-galaktozidāžu raksturojums apkopots 2. tabulā.

2. tabula / Table 2

Pētījumā lietotās komerciālās β-galaktozidāzes/ Commercial β-galactosidases used in the study

Enzīms / <i>Enzyme</i>	NOLA™Fit5500	Ha-Lactase 5200	GODO-YNL2
Aktivitāte / <i>Activity</i>	5500 BLU g ⁻¹	5200 NLU g ⁻¹	5000 NLU g ⁻¹
Avots / <i>Source</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Piegādātājs / <i>Supplier</i>	Chr.HANSEN Dānija / Denmark	Chr.HANSEN Dānija / Denmark	Danisco Dānija / Denmark
Optimālais pH / <i>Optimal pH</i>	5.4 – 7.0	6.5 – 8.0	7.5 – 8.0

2. tabulas turpinājums / *Continuation of Table 2*

Enzīms / Enzyme	NOLA™Fit5500	Ha-Lactase 5200	GODO-YNL2
Optimālā temperatūra, / Optimal temperature, °C	35 – 50	35 – 45	40 – 45
Literatūras avots / Reference	NOLA™Fit5500 Produkta informācija	Ha-Lactase 5200 Produkta informācija	GODO-YNL2 Produkta informācija

Pētījuma laikā enzīmi un produkti uzglabāti +4° C temperatūrā, lai saglabātu aktivitāti un kvalitāti.

Pētījuma struktūra

Pētnieciskais darbs strukturēts piecos posmos (apkopoti 3. tabulā), kurā katrs posms dod ieguldījumu sīrupa salduma palielināšanai.

3. tabula / *Table 3*

Pētījuma posmi / *The stages of the research*

Posms / Stage	Raksturojums / Description
I posms / Stage I	Komerčiālo β-galaktozidāžu stabilitātes izpēte / <i>Research on the stability of commercial β-galactosidases</i>
II posms / Stage II	Laktozes fizikālo īpašību izpēte ultrafiltrātos / <i>The study of physical properties of lactose in whey permeates</i>
III posms / Stage III	Laktozes hidrolīzes dinamika dažādā ultrafiltrāta sausnas saturā / <i>Dynamics of the hydrolysis of lactose in the various permeates solids concentrations</i>
IV posms / Stage IV	Glikozes-galaktozes sīrupa salduma paaugstināšanas izpēte divpakāpju fermentācijā / <i>The study of glucose-galactose syrup sweetness in two-stage fermentation</i>
V posms / Stage V	Sīrupu sensorā novērtēšana / <i>The sensory evaluation of syrups</i>

Pētījuma **I posmā** detalizētāk analizētas komerciālo β-galaktozidāžu fizikālās un ķīmiskās īpašības:

- metāla jonu ietekme uz enzīmu aktivitāti (kalcijs, nātrijs, kālijs un magnijs);
- laktozes hidrolīzes izpēte ar kuņģa-zarnu trakta modeļvidē apstrādātu β-galaktozidāzi;
- dažādu metožu izvērtējums enzīmu aktivitātes un laktozes hidrolīzes noteikšanai.

Pētījuma **II posmā** izmantotas siera un biezpiena sūkalas, lai izvērtētu ultrafiltrāta:

- kristalogrāfiskās īpašības;
- termiskās īpašības;
- laktozes kristālu morfoloģiju.

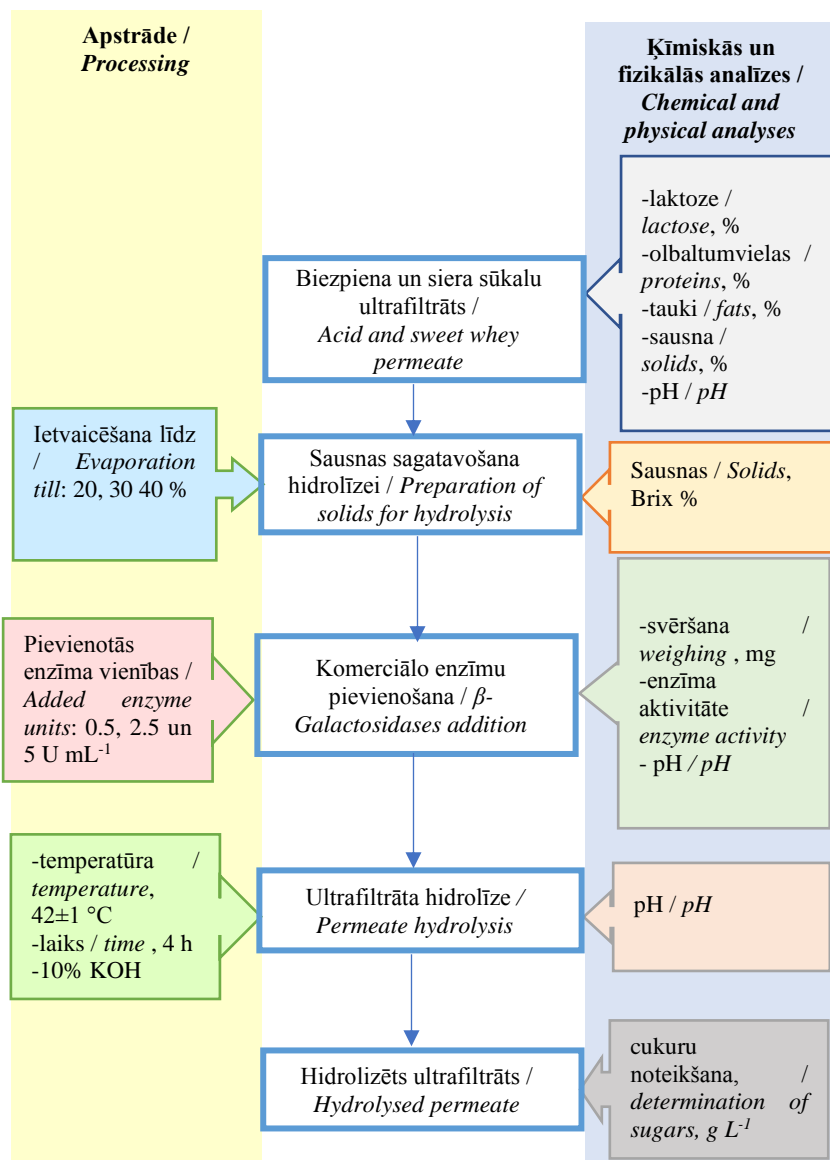
No zinātniskiem rakstiem izvēlētas analīžu metodes, lai pētītu ultrafiltrāta sastāva ietekmi uz laktozes kristālu fizikālo stāvokli, to kristālisko fāžu pāreju un uzvedību.

Pirmais un otrais posms tika īstenots, lai vispusīgi analizētu pētījuma objektus, to rezultāti satur nozīmīgu informāciju **III posmā** plānotajās aktivitātēs.

Šajā posmā analizēti un vērtēti visi hidrolīzes parametri: pH, sausna, enzīmu aktivitātes vienības, lai modelētu efektīvāko glikozes-galaktozes sīrupa ar lielāko salduma pakāpi iegūvi (1. att.).

Ultrafiltrāti hidrolizēti ar komerciālo glikozes - galaktozes sīrupa ražošanai piemēroto tehnoloģiju.

Ekspērimētā izvēlēti ultrafiltrāti ar dažādu sausnu (20, 30 un 40%) un komerciālo enzīmu vienībām 0.5, 2.5 un 5 U ml⁻¹. Ultrafiltrāta sausnas palielināšanai izmantots rotācijas vakuuma ietvaicētājs. Variācija ar sausnu un enzīma vienībām ir nepieciešama, lai novērtētu hidrolīzē iegūto cukuru saturu, iegūtu labākas zināšanas par komerciālo enzīmu īpašībām, arī izprastu, kura kombinācija atbilst augstākajai laktozes hidrolīzes pakāpei. Turklāt šis pētījums sniedz vērtīgu informāciju par monosaharīdu profilu, tostarp glikozes-galaktozes sīrupa uzturvērtību.

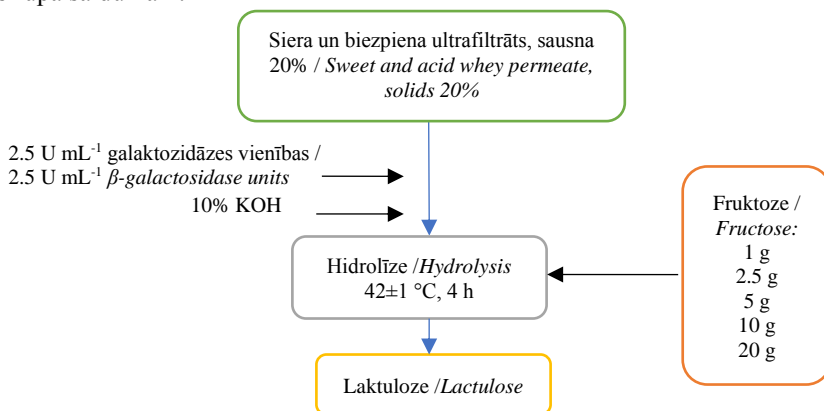


1. att. Biezpiena un siera sūkalu ultrafiltrāta hidrolīzes shēma /
 Fig. 1. Schema of acid and sweet whey permeate hydrolysis

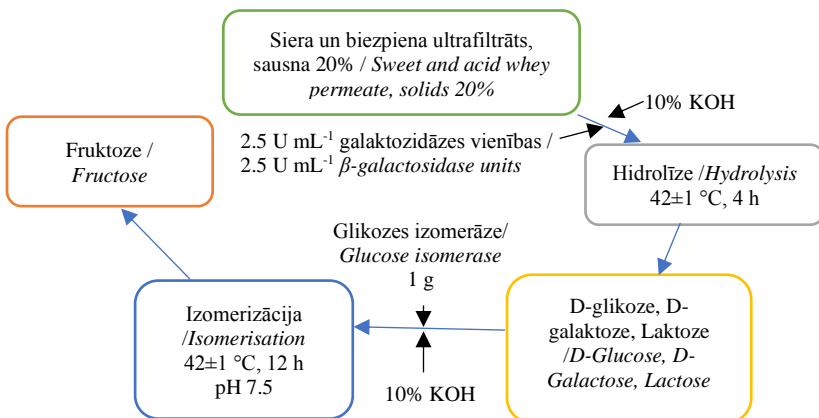
IV posmā pētīta pievienotās fruktozes ietekme uz laktulozes sintēzi. Šajā posmā analizēta:

- 1) laktulozes sintēzes iespēja, pievienojot fruktozi no 1 līdz 20 g 100 mL ultrafiltrāta (2. att.);
- 2) divpakāpju fermentācija, pievienojot 1 g glikozes izomerāzes 100 mL ultrafiltrāta (3. att.).

Šis pētījums deva vērtīgas atziņas par iegūto cukuru profilu, kas ir būtisks sīrupa saldumam.



2. att. Laktulozes sintēze, pievienojot fruktozi /
Fig. 2. Lactulose synthesis by adding fructose



3. att. Divpakāpju enzimatiskā hidrolīze ar β -galaktozidāzi un glikozes izomerāzi /Fig. 3. Two-stage enzymatic hydrolysis by β -galactosidase and glucose isomerase

V posmā veikta paraugu sensorā novērtēšana divos etapos:

- 1) hidrolizēto siera un biezpiena sūkalu ultrafiltrātu sensorais novērtējums, kā kontrole izmantots komerciālais glikozes-galaktozes sīrups, kuram sausna samazināta līdz 20%, izmantojot destilēto ūdeni. Hidrolizētos paraugus vērtēja 36 apmācīti vērtētāji, izmantojot 12-punktu nestrukturētu līnijaskalu (Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģijas fakultātes studenti un darbinieki).
- 2) divpakāpju fermentācijā iegūtajiem sīrupu paraugiem veikts sensorais novērtējums, izmantojot 12-punktu nestrukturētu līnijaskalu. Šiem paraugiem sausna bija 70% un komerciālais glikozes-galaktozes sīrups lietots kā kontrole. Sīrupus novērtēja 30 apmācīti vērtētāji (Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģijas fakultātes studenti un darbinieki).

Pētījumos izmantoto analīžu metožu raksturojums

Darba veikšanai izmantotās analīžu metodes, lietotās iekārtas un standarti apkopoti 4. tabulā

4. tabula / Table 4

Pielietotie standarti, iekārtas un metodes / *Applied standards, equipment and methods*

Nr./ No	Rādītāji / <i>Indicators</i>	Standarts, iekārta un metode/ <i>Standard, equipment and methods</i>
Fizikālie rādītāji / <i>Physical parameters</i>		
1.	β -galaktozidāzes aktivitāte / <i>β-galactosidase activity</i>	Noteikšana ar glikozimetru / <i>Glucose strip test</i> (Pandalaneni & Amamcharla, 2018) Hromatogrāfijas metode / <i>Chromatography method</i> (Žolnere <i>et al.</i> , 2018) Spektrofotometriskā metode / <i>Spectrophotometric method</i> (AOAC 998.04)
2.	Sasalšanas punkts / <i>Freezing point, °C</i>	ISO 5764:2009
3.	Optiskā rotācija / <i>Optical rotation, (°)</i>	Polarimetrija / <i>Polarimetry</i>
4.	Rentgendifraktogramma / <i>X-ray diffractogram</i>	Rentgendifraktometrija / <i>X-ray diffractometry</i>
5.	Morfoloģija / <i>Morphology</i>	Skenējošā elektronmikroskopija / <i>Scanning electron microscopy</i> (Kougoulos <i>et al.</i> , 2010)
6.	Kristālisko formu kušanas un fāžu pārejas temperatūras / <i>Melting and phase transition temperatures of crystalline forms</i>	Diferenciāli skenējošā kalorimetrija / <i>Differential scanning calorimetry</i>

4. tabulas turpinājums / *Continuation of Table 4*

Nr./ No	Rādītāji / <i>Indicators</i>	Standarts, iekārta un metode/ <i>Standard, equipment and methods</i>
7.	Masas izmaiņu atkarība no temperatūras / <i>Change in mass depending on the temperature</i>	Termogravimetriskā analīze / <i>Thermogravimetric analyses</i>
8.	pH / <i>pH</i>	ISO 5546:2010
Kīmiskie rādītāji / <i>Chemical parameters</i>		
10.	Makroelementi / <i>Macroelements</i> : Mg, Ca, Na, K,	Atomabsorbcijas spektrofotometrija / <i>Atomic Absorption Spectrophotometry</i>
11.	PO ₄	Spektrofotometrija / <i>Spectrophotometry</i>
12.	Sausna / <i>Solids</i>	ISO 2173:2003
13.	Cukuru saturs / <i>Amount of sugars</i> : laktoze, fruktoze, galaktoze, glikoze, laktuloze / <i>lactose, fructose, glucose, galactose, lactulose</i>	Hromatogrāfijas metode / <i>Chromatography method</i> (Žolnere et al., 2018)
14.	GOS (galakto-oligosaharīdi) saturs / <i>GOS (galactooligosaccharides) content</i>	Hromatogrāfijas metode / <i>Chromatography method</i> (Lee et al., 2014)
15.	Tauku saturs / <i>Fat content</i> Olbaltumvielu saturs / <i>Protein content</i> Laktozes saturs / <i>Lactose content</i>	MilkoScan TM Mars
16.	Kopējo olbaltumvielu saturs / <i>Total proteins concentration</i>	ISO 8968-1:2002
Sagremojamības izvērtēšana / <i>Evaluation of digestibility</i>		
17.	<i>In vitro</i> sagremojamība kuņģa zarnu trakta modeļvidē / <i>In vitro digestion at gastric intestinal tract model</i>	Minekus et al. 2014)
Sensorā novērtēšana / <i>Sensory evaluation</i>		
18.	Sensorā novērtēšana / <i>Sensory evaluation</i>	12-punktu nestrukturēta līniskala / <i>12-point unstructured line scale</i> (ISO 4121:2003)

Datu statistiskā analīze

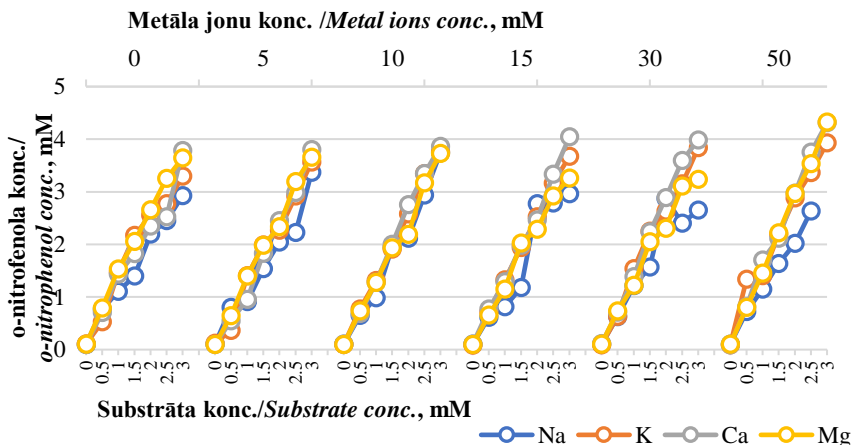
Rezultāti izteikti kā vidējā aritmētiskā vērtība ± standartnovirze (SD). Pētījuma rezultāti iegūti trijos atkārtojumos. Statistiskās analīzes veiktas, izmantojot divfaktoru un vienfaktora dispersijas analīzi ANOVA un Tjukija testu. Iegūto datu būtiskuma līmeni raksturo p vērtība (ja $p > 0.05$, rezultāti būtiski neatšķiras, ja $p < 0.05$, rezultāti būtiski atšķiras). Visi dati tika aprēķināti MS Excel 2019 programmatūrā.

Sensorās novērtēšanas rezultāti analizēti, izmantojot galveno komponentu analīzi (PCA), kurā mainīgie bija sensoro īpašību novērtējums un lietotie enzīmi. Šie rezultāti analizēti ar divfaktoru dispersijas analīzi ANOVA. Statistiskā analīzes veikta, izmantojot programmu IBM SPSS 22.0 (SPSS Inc.).

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

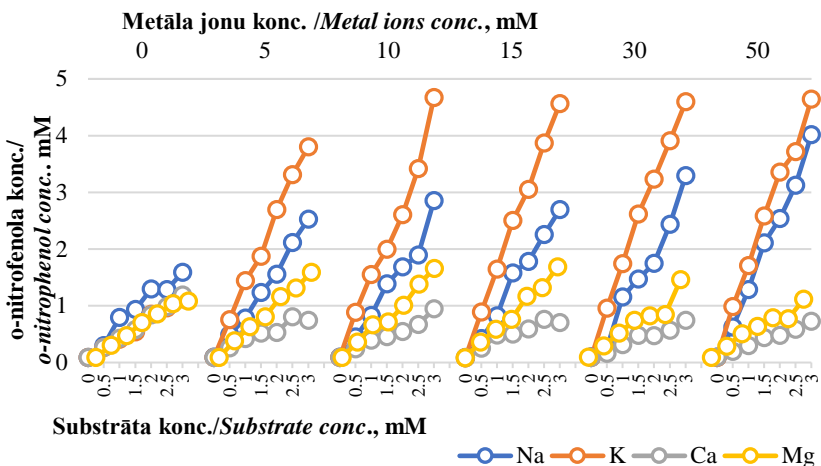
1. Kalcija, nātrija, kālija un magnija jonu ietekme uz β -galaktozidāzes aktivitāti

Jonu ietekme uz NOLATMFit5500 β -galaktozidāzes aktivitāti ir parādīta 4. attēlā. Enzīma aktivitāte bija stabila metāla jonu koncentrācijā līdz 10 mM. Sākot ar 15 mM, tika novērotas izmaiņas enzīma aktivitātē. Enzīms kļuva mazāk aktīvs nātrija (Na^+) koncentrācijas diapazonā no 15 līdz 50 mM un magnija (Mg^{2+}) koncentrācijas diapazonā no 15 līdz 30 mM. Kālijs (K^+) un kalcijs (Ca^{2+}) koncentrācijas diapazonā no 0 līdz 50 mM būtiski neietekmēja enzīma aktivitāti. Līdzīgus pētījumus veica Juajun *et al.* (2011), konstatējot, ka monovalentie joni, piemēram, Na^+ un K^+ , uzrāda aktivatora īpašības, hidrolīzei izmantojot ONPG un *Bacillus licheniformis* β -galaktozidāzi. Turpretī Ca^{2+} un Mg^{2+} koncentrācijas diapazonā no 1 līdz 10 mM enzīmu tikai nedaudz aktivizēja, un šī atziņa var būt noderīga laktozes hidrolīzei pienā un sūkalās.



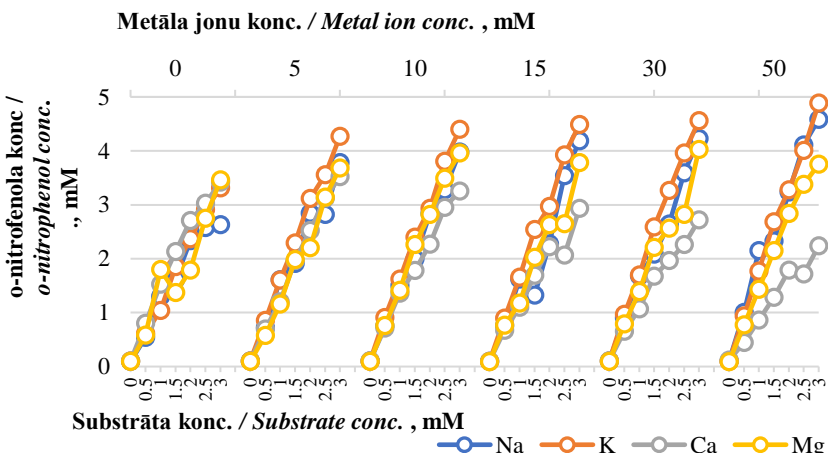
4. att. Metāla jonu ietekme uz NOLATMFit5500 β -galaktozidāzes aktivitāti / Fig.4. The impact of metal ions on NOLATMFit5500 β -galactosidase activity

Savukārt metāla joni dažādi ietekmēja GODO-YNL2 β -galaktozidāzes (iegūta no *Kluyveromyces lactis*) aktivitāti, skatīt 5. attēlu. Kālija koncentrācijas diapazonā no 5 līdz 50 mM enzīms uzrādīja visaugstākos rezultātus, apliecinot to kā enzīma aktivatoru. Savukārt Na^+ jonu ietekme uz enzīma aktivitāti bija pakāpeniska, pieaugot Na^+ koncentrācijai, enzīma aktivitātei palielinājās. Visos mērījumos Ca^{2+} joni uzrādīja viszemākos rezultātus, un tiek uzskatīti par inaktivatoru. Mg^{2+} joni arī darbojās kā enzīma inaktivators koncentrācijas diapazonā no 30 līdz 50 mM.



5. att. Metāla jonu ietekme uz GODO-YNL2 β -galaktozidāzes aktivitāti /
Fig. 5. The impact of metal ions on GODO-YNL2 β -galactosidase activity

Ha-Lactase 5200 β -galaktozidāzes (iegūta no *Kluyveromyces lactis*) aktivitāti katrs metāla jons ietekmē atšķirīgi. 6. attēlā ir parādīts, ka K^+ , Mg^{2+} un Na^+ joni koncentrācijas diapazonā no 5 līdz 50 mM palielināja enzīma aktivitāti, visi joni tiek uzskatīti par aktivatoriem, turpretī Ca^{2+} koncentrācijā sākot ar 10 mM enzīma aktivitāti samazināja.



6 att. Metāla jonu ietekme uz Ha-Lactase 5200 β -galaktozidāzes aktivitāti/
Fig. 6 The impact of metal ions on Ha-Lactase 5200 β -galactosidase activity

Vairāki pētījumi apliecina, ka K^+ un Na^+ joni ir β -galaktozidāzes aktivatori, kas palielina *Kluyveromyces lactis* izcelsmes β -galaktozidāzes aktivitāti (Adalberto *et al.*, 2010; Jurado *et al.*, 2004; Wojciechowska *et al.*,

2018). Turpretī ir maz informācijā, kurā būtu daudz detalizētāk apskatīta un izklāstīta šo jonu ietekme uz β -galaktozidāzes aktivitāti (Rico-Rodríguez *et al.*, 2020).

5. tabula / Table 5

Makroelementu un fosfātu saturs (mg kg^{-1}) dažāda sausnas satura ultrafiltrātos / Content (mg kg^{-1}) of macroelements and phosphates in different solids permeates

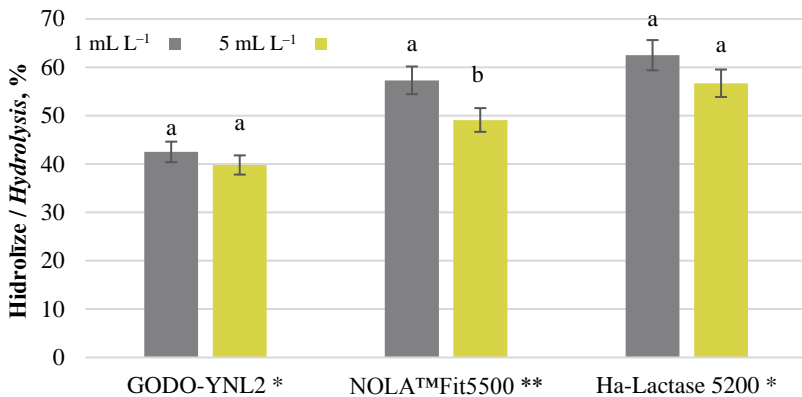
Ultrafiltrāts / Permeates	Makroelementi un fosfāti/Macroelements and phosphates, mg kg^{-1}				
	Ca^{2+}	Na^+	K^+	Mg^{2+}	PO_4^{3-}
Siera / Sweet, 5%	349±14	429±11	1480±100	57±9	275±61s
Biezpiena / Acid, 5%	1322±83	469±67	1636±189	123±16	736±34
Siera / Sweet, 20%	1071±99	660±57	2710±55	260±13	1265±50
Biezpiena / Acid, 20%	3400±86	1100±55	5600±140	340±18	2200±56

Makroelementu saturs ultrafiltrātos dod labāku izpratni par to ietekmi uz enzīma aktivitāti. Kālijs dominē visos paraugos, kas dod pārlicību, ka citu elementu klātbūtne (kas varētu darboties kā inaktivatori) neietekmētu β -galaktozidāzes aktivitāti un hidrolīzes pakāpe saglabātos augsta. Viena no garšas maņām, kuru var izmantot sūkalu aprakstam, ir sāļa. Makroelementu saturs, kas dots 5. tabulā, parāda, ka nātrija un kālija saturs ir atšķirīgs. Abi elementi kombinācijā veido sāļi rūgto garšu, kas aprakstīta arī Chandrapala *et al.*, (2015) un Frankowski *et al.*, (2014) pētījumos.

2. Komerčiālās β -galaktozidāzes stabilitātes izpēte kuņģa-zarnu trakta modeļvidē

Eksperiments tika veikts *in vitro* apstākļos, lai analizētu komerčiālās β -galaktozidāzes relatīvo stabilitāti.

Šī pētījuma nozīmīgums ir saistīts ar literatūrā ierobežoti pieejamo informāciju par β -galaktozidāzes *in vitro* pētījumiem, tāpēc ir svarīgi novērtēt šīs īpašības.

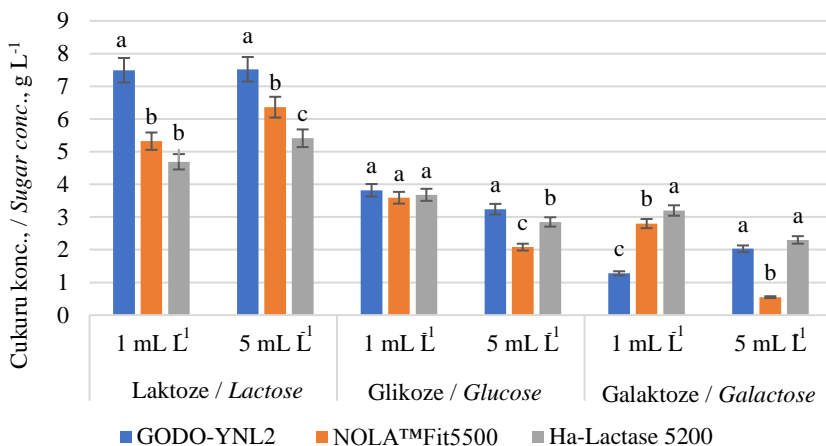


7 att. KZT pakļautās β -galaktozidāzes laktozes hidrolīzes (%) pakāpe /
 Fig. 7. Lactose hydrolysis (%) after GIT withstand β -galactosidase

Vērtības apzīmētas ar vienādu burtu katram enzīmam dažādās koncentrācijās būtiski neatšķiras ($p > 0.05$) / The values marked with the same letter for each enzyme at different concentrations do not differ significantly ($p > 0.05$)

Tika novērota būtiska atšķirība hidrolīzes iznākumā gan starp enzīmiem ($p < 0.05$), gan starp viena enzīma dažādām koncentrācijām ($p < 0.05$).

Kā parādīts 7. attēlā, Ha-Lactase 5200 ($62.5 \pm 3.9\%$) un NOLA™Fit5500 ($57.3 \pm 4.3\%$) β -galaktozidāzes koncentrācijā 1 ml L⁻¹ uzrāda augstāku laktozes hidrolīzes pakāpi. Savukārt GODO-YNL2 β -galaktozidāze demonstrēja nelielu hidrolīzes pakāpi enzīma koncentrācijā 1 un 5 ml L⁻¹. Šos rezultātus var izskaidrot ar temperatūras un pH izmaiņām kuņģa-zarnu trakta modeļvidē. Eksperimenta laikā vides temperatūra bija 37 °C, kas ir mazāk efektīva GODO-YNL2 β -galaktozidāzei (40 °C), bet NOLA™Fit5500 (35–50 °C) un Ha-Lactase 5200 (35–45 °C) β -galaktozidāzes iekļāvās optimālā intervāla robežās. Kuņģa modeļvidē pH ir 2, bet tievo zarnu modeļvidē pH 7. *Kluyveromyces lactis* enzīmi (GODO-YNL2 un Ha-Lactase 5200) darbojas pH diapazonā no 6.5 līdz 8.0, savukārt *Bacillus licheniformis* β -galaktozidāze (NOLA™Fit5500) darbojas nedaudz skābākos apstākļos diapazonā no 5 līdz 7 pH. Vairāku pētījumu (Dagbagli & Goksungur, 2008; Vidya *et al.*, 2014) rezultāti ir pierādījuši, ka β -galaktozidāzes aktivitāti un stabilitāti ietekmē enzīma producents, tā darbības apstākļi (temperatūra, pH, aerācija, maisīšana, inkubācijas laiks) un komponenti, kas atrodas substrātā. Turklāt Vrese *et al.* (2001) secināja, ka komerciālā β -galaktozidāze kopā ar probiotiku β -galaktozidāzi spēj izdzīvot kuņģa vidē, un arī zarnās. Pamatojoties uz eksperimenta rezultātiem, ir noskaidrots, ka enzīmi spēj saglabāt savu aktivitāti *in vitro* testos.



8 att. KZT pakļautās β -galaktozidāzes laktozes hidrolīzes produktu novērtējums / Fig. 8. Evaluation of lactose hydrolysis products subjected by GIT β -galactosidase

Vērtības apzīmētas ar vienādu burtu katra enzīma un cukura ietvaros būtiski neatšķiras ($p > 0.05$) / The values marked with the same letter within each enzyme and sugar concentration do not differ significantly ($p > 0.05$)

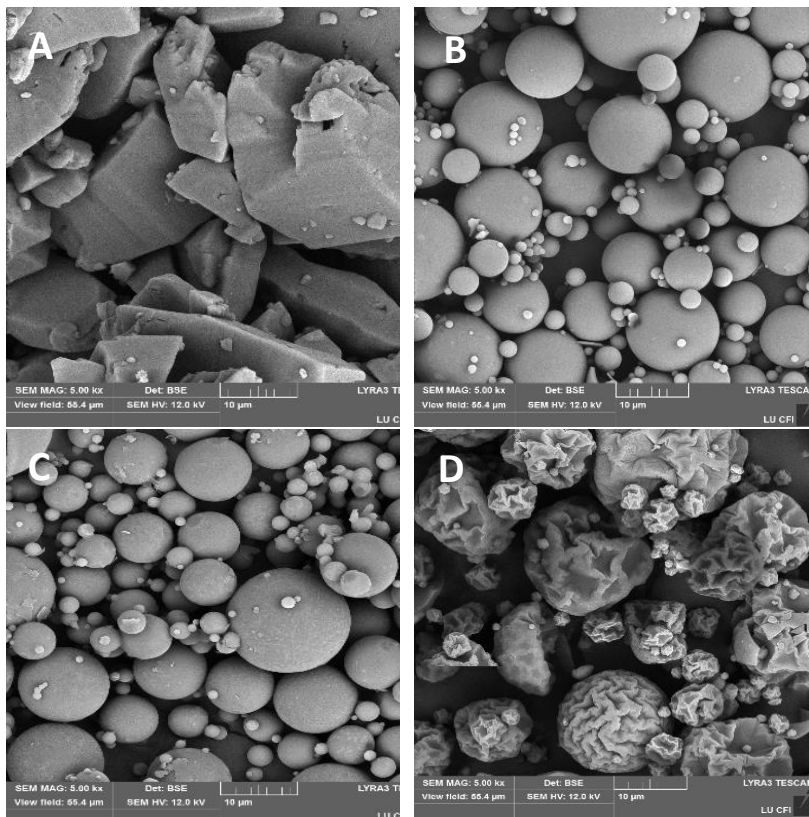
Laktozes hidrolīzes rezultāti, izmantojot *Bacillus licheniformis* un *Kluyveromyces lactis* β -galaktozidāzes, būtiski atšķīrās ($p < 0.05$). Salīdzinoši augsta laktozes hidrolīzes pakāpe tika sasniegta ar NOLA™Fit5500 un Ha-Lactase 5200 β -galaktozidāzēm koncentrācijā 1 mL L⁻¹.

Kā parādīja 8. attēla rezultāti, augstākā hidrolīzes pakāpe tika sasniegta, izmantojot 1 mL L⁻¹. Jāatzīmē, ka pētījuma metodes pamatā bija attiecība starp pārtiku, gremošanas enzīmiem un pamatšķīduma devu. Rezultāti demonstrēja, ka mazās enzīma koncentrācijas, visticamāk, saglabā aktivitāti KZT vidē. Jāatzīmē, ka *in vitro* eksperimentos tika pievienoti dažādi enzīmi un nodrošināti dažādi vides parametri un vielu koncentrācija, kas arī visvairāk ietekmē β -galaktozidāzes aktivitāti.

Kotz *et al.* (1994) salīdzināja β -galaktozidāzes aktivitāti komerciālā nearomatizētā jogurtā un jogurtā ar augstu β -galaktozidāzes saturu, kuru 60 minūtes hidrolizēja 37 °C temperatūrā un pH 3.5. Jogurtā ar augstu β -galaktozidāzes saturu enzīms uzrādīja zemāku aktivitāti skābā vidē nekā β -galaktozidāze komerciālajā jogurtā, kas būtu pamatojums iespējamai β -galaktozidāzes inaktivācijai KZT. Autori secināja, ka augstai enzīma koncentrācijai un zemam substrāta pH ir būtiska ietekme uz β -galaktozidāzes aktivitāti un denaturāciju KZT.

3. Dehidratēta sūkalu ultrafiltrāta fizikālās īpašības

Dehidratēto paraugu, kas iegūti no 5% α -laktozes monohidrāta šķīduma, siera un biezpiena sūkalu ultrafiltrāta, kā arī α -laktozes monohidrāta kristālu virsmas morfoloģija tika analizēta, izmantojot skenējošo elektronmikroskopu, skatīt 9. att..



9. att. Laktozes kristālu virsmas morfoloģija /

9. att. *Surface morphology of lactose crystals*

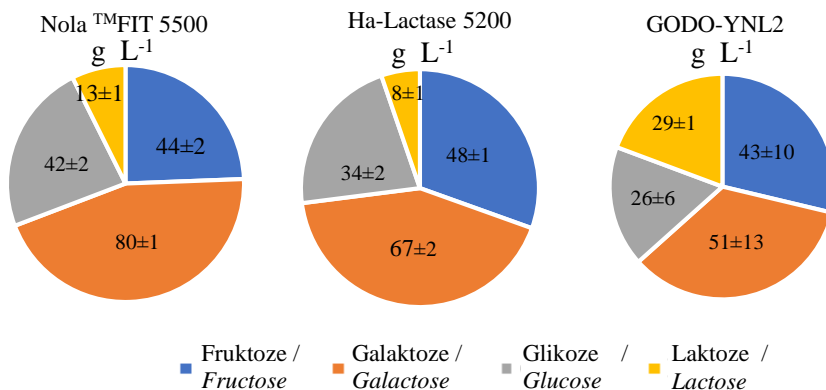
α -Laktozes monohidrāta kristāli (A) un izsmidzināšanas kaltē iegūtās laktozes kristāli (iegūti no 5% α -laktozes monohidrāta šķīduma (B)); sausā siera sūkalu ultrafiltrāta (C); sausā biezpiena sūkalu ultrafiltrāta (D) virsmas morfoloģija. Visi attēli doti 5000×palielinājumā / *Fig. 9. Surface morphology of α -lactose monohydrate crystals (A) and spray dried lactose obtained from 5% of α -lactose monohydrate solution (B); from sweet whey permeate (C); from acid whey permeate (D). All micrographs are shown at 5000× magnification*

9. att. ir redzams, ka B, C un D paraugos laktoze ir ieguvusi amorfo formu. Gänzle *et al.* (2008) ziņoja, ka izsmidzināšanas laikā ūdens iztvaikošana notiek ļoti ātri, palielinās šķīduma viskozitāte, tāpēc arī kristāli neizveidojas un laktoze saglabā amorfo formu. α -Laktozes monohidrāta kristāliskā forma ir *Tomahawk* kristālu veidā (9. A att.), kuriem ir slīpēta struktūra (Wong & Hartel, 2014). Tika novērotas laktozes virsmas atšķirības starp ultrafiltrātu paraugiem. Paraugiem, kas iegūti no 5% α -laktozes monohidrāta šķīduma (9. B att.) un siera sūkalu ultrafiltrāta (9. C att.), laktozes virsma bija gluda, bez izteiktām atšķirībām, kamēr biežpiena sūkalu ultrafiltrāta laktozei (9. D att.) virsma ir gan gluda, gan krokota, novērojamas plaisas un lūzumi. Biezpienu sūkalu pH ir zem 6 (skat. 1. tab.), kas varētu būt par galveno iemeslu atšķirīgai laktozes virsmas morfoloģijai.

4. Glikozes izomerizācija sīrupa salduma palielināšanai

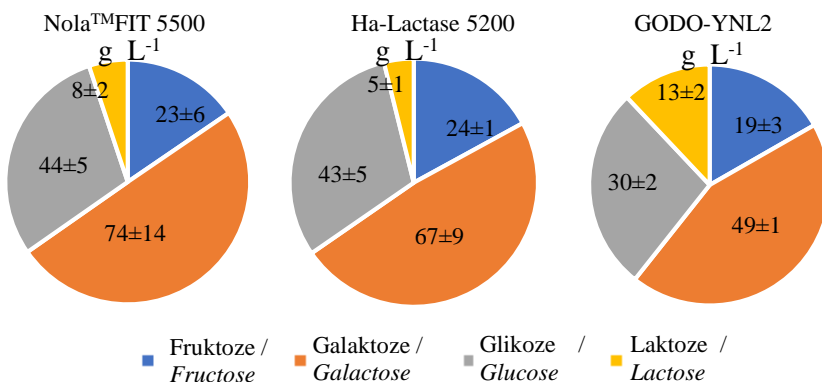
Lai iegūtu saldāku sīrupu, tika veikta tā hidrolīze, ar tālāku glikozes izomerizāciju fruktozē.

Ekspiments veikts, izmantojot siera un biežpiena sūkalu ultrafiltrātus ar sākotnējo sausnu, attiecīgi, $205 \pm 3 \text{ g L}^{-1}$ un $180 \pm 10 \text{ g L}^{-1}$.



10. att. Cukuru saturs siera sūkalu ultrafiltrātā, izmantojot glikozes izomerāzi / Fig. 10 Sugar concentration in sweet whey permeate using glucose isomerase

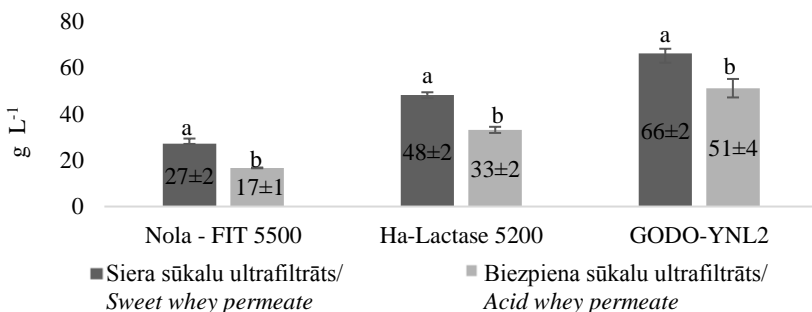
10. attēla dati parāda, ka divpakāpju fermentācijā iegūtie siera sūkalu ultrafiltrāta paraugi satur fruktozi intervālā no 43 ± 10 līdz $48 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$.



11. att. Cukuru saturs biežpiena sūkalu ultrafiltrātā, izmantojot glikozes izomerāzi / Fig. 11 Sugar concentration in acid whey permeate using glucose isomerase

11. attēla dati parāda, ka divpakāpju fermentācijā iegūtā biežpiena sūkalu ultrafiltrāta paraugi satur fruktozi intervālā no 19±3 līdz 24±1 g L⁻¹. Laktozes saturs paraugos norāda, ka β-galaktozidāzes darbību ierobežoja glikozes izomerāze (Andrade *et al.*, 2020). Salīdzinot fruktozes saturu, siera sūkalu ultrafiltrāta paraugos fruktozes veidošanās ir intensīvāka nekā biežpiena sūkalu ultrafiltrāta paraugos. Augstākais fruktozes saturs 48±1 g L⁻¹ (10. att.) un 24±1 g L⁻¹ (11. att.) tika iegūts paraugos, kuros izmantoja Ha-Lactase 5200 β-galaktozidāzi, un 44±2 g L⁻¹ (10. att.) un 23±6 g L⁻¹ (11. att.) ar NOLA™Fit5500 β-galaktozidāzi. Savukārt ultrafiltrāta paraugi ar GODO-YNL2 uzradīja mazāko monosaharīdu saturu, attiecīgi, saglabājušos laktozes saturu.

Paraugiem tika analizēts arī galakto-oligosaharīdu (GOS) saturs, tas atspoguļots 12. attēlā.

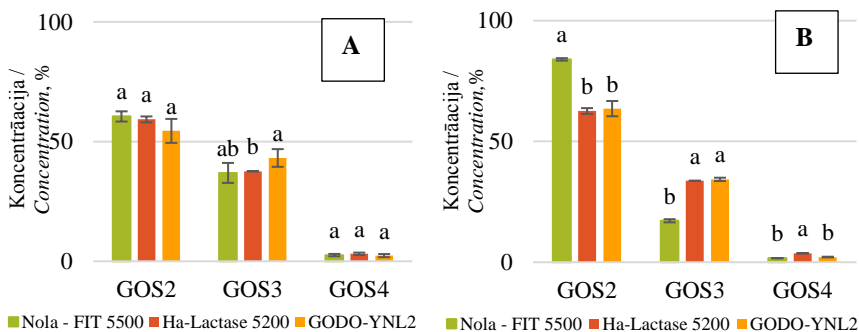


12. att. Kopējais galakto-oligosaharīdu saturs (g L⁻¹) paraugos / Fig. 12 Concentration of total galacto-oligosaccharides (g L⁻¹) in samples

Vērtības apzīmētas ar vienādu burtu katrā enzīma ietvaros būtiski neatšķiras ($p > 0.05$) / The values marked with the same letter within each enzyme do not differ significantly ($p > 0.05$)

Kopumā iegūtais galakto-oligosaharīdu saturs (12. att.) hidrolizētā biezpiena sūkalu ultrafiltrātā svārstījās intervālā no 17 ± 1 līdz 51 ± 4 g L⁻¹, bet siera sūkalu ultrafiltrātā no 27 ± 2 līdz 66 ± 2 g L⁻¹. Eksperiments parādīja, ka GODO-YNL2 β -galaktozidāzei ir augstākā GOS producēšanas aktivitāte, bet NOLA™Fit5500 β -galaktozidāzei ir vismazākā. GOS iznākums ir atkarīgs no temperatūras, pH, reakcijas laika, β -galaktozidāzes avota un sākotnējās laktozes koncentrācijas. Turklāt transgalaktozidēšanas reakciju var veicināt arī maza ūdens aktivitāte (Botvynko *et al.*, 2019). Luzzi *et al.* (2020) laktozes hidrolīzei un GOS sintēzei izmantoja četrus komerciālos β -galaktozidāzes enzīmus, rezultātā mazākais GOS saturs 71 g L⁻¹ tika iegūts, izmantojot NOLA™Fit5500 β -galaktozidāzi, kas ir iegūts arī mūsu pētījumā. Savukārt Andrade *et al.* (2020) secināja, ka, izmantojot GODO-YNL2 β -galaktozidāzi GOS sintēzei kazas pienā, tika iegūti 5.9 ± 1.0 % GOS, kas ir tuvu mūsu rezultātiem. Šie rezultāti apstiprina katras β -galaktozidāzes GOS veidošanas spēju un ir iespējams iegūt glikozes-galaktozes sīrupu ar potenciāli atšķirīgām prebiotiskām īpašībām. Pamatojoties uz β -galaktozidāzes izcelsmi, enzīms, ko iegūst no *Kluyveromyces lactis*, sintezē β -(1→6) galakto-oligosaharīdus, galvenokārt 6'-galaktozilaktozi, alolaktozi un 1-6- β -D-galaktobiozi, bet no *Bifidobacterium bifidus* iegūst GOS ar β -(1→3) saiti (Gänzle, 2012).

Lai noteiktu produktīvāko β -galaktozidāzes preparātu GOS sintēzei siera un biezpiena sūkalu ultrafiltrātos, katrs GOS saturs tika izteikts procentos no kopējā GOS satura paraugos.



13. att. Galakto-oligosaharīdu saturs (%) A – siera sūkalu ultrafiltrāta un B – biezpiena sūkalu ultrafiltrāta paraugos / Fig. 13 Galacto-oligosaccharides concentration (%) in A – sweet whey permeate and B- acid whey permeate samples

Vērtības apzīmētas ar vienādu burtu katrā galakto-oligosaharīda ietvaros būtiski neatšķiras ($p > 0.05$) / The values marked with the same letter within each galacto-oligosaccharide do not differ significantly ($p > 0.05$)

Kā redzams 13. attēlā, katram enzīmam ir specifiska transgalaktolītiskā aktivitāte. GOS ir īso ķēžu ogļhidrāti, kurus veido 2 līdz 20 galaktozes molekulas un viena glikozes molekula (Tokošová *et al.*, 2015). Visas β -galaktozidāzes

galvenokārt veido disaharīdus (GOS2) (kas varētu būt galaktobioze, alolaktoze) un trisaharīdu (GOS3) (kas varētu būt 6 galaktozilaktoze). Var noteikt arī nelielu tetrasaharīdu (GOS4) koncentrāciju. Pētījumi parādīja, ka no siera sūkalu ultrafiltrāta var iegūt vairāk GOS. Biezpiena sūkalu ultrafiltrāta augstāko GOS2 saturu radīja NOLATMFit5500 β-galaktozidāze - 84±1%, bet GOS3 - GODO-YNL2 un Ha-Lactase 5200 β-galaktozidāzes 34±1 un 37±4%, respektīvi. Salīdzinot GOS veidus, abos sūkalu ultrafiltrātos enzīms parādīja tendenci veidot lielāku GOS2 saturu. Laktozes izomērs alolaktoze ir disaharīds, līdzīgs laktozei, kur β-1→6 glikozīdsaites vietā ir β-1→4 saite. Tas norāda, ka β-galaktozidāzei ir papildus saites modifikācijas loma (Otieno, 2010; Osman, 2016).

Fischer & Kleinschmidt (2015) ziņoja, ka *Klyveromyces lactis* β-galaktozidāzes transgalaktozilēšanas reakcija ir atkarīgas no sāļu satura sūkalās. Būtisku ietekmi uz enzīmu aktivitāti atstāj pievienotais 10% KOH. Izmantojot KOH substrāta pH pielāgošanai, vidē palielinās K⁺ jonu koncentrācija. Metāla jonu ietekme uz β-galaktozidāzes aktivitāti galvenokārt balstās uz jonu rādiusu, kas ietekmē arī enzīma struktūru (Rajakala & Selvi, 2006).

5. Sīrupu sensorā novērtēšana

Ar NOLATMFit5500 un Ha-Lactase 5200 enzīmiem apstrādātie paraugi tika novērtēti līdzīgi (8.6) un bija ievērojami ($p < 0.05$) saldāki, salīdzinot ar kontroles un GODO-YNL2 paraugiem, 6. tabula. Pamatojoties uz iegūtajiem pētījuma rezultātiem, izvēlētais ultrafiltrāta sausas saturs 20% un 2.5 U mL⁻¹ enzīma vienības ir efektīvas salduma intensitātes palielināšanai.

6. tabula / Table 6

Hidrolizēto siera sūkalu ultrafiltrāta paraugu sensoro īpašību intensitātes novērtējums / *Sensory attributes intensity of hydrolysed sweet whey permeate samples*

Īpašība/Attribute	Kontrole/Control	NOLA TM Fit5500	Ha-Lactase 5200	GODO-YNL2
Saldā garša/ <i>Sweet taste</i>	7.2 ^b	8.6 ^a	8.6 ^a	7.5 ^b
Skābā garša/ <i>Sour taste</i>	1.0 ^a	1.9 ^b	1.2 ^a	1.1 ^a
Sāļā garša/ <i>Salty taste</i>	1.2 ^b	1.9 ^a	1.8 ^a	1.7 ^a
Pēcgarša/ <i>Aftertaste</i>	2.8 ^b	7.2 ^a	6.6 ^a	7.0 ^a

Vērtības apzīmētas ar vienādu burtu katras rindas ietvaros būtiski neatšķiras ($p > 0.05$) / *The values marked with the same letter within each row do not differ significantly ($p > 0.05$)*

Hromatogrāfiskie rezultāti parādīja, ka kontroles paraugs satur 73±3 g L⁻¹ glikozes, 59±1 g L⁻¹ galaktozes, 15±4 g L⁻¹ laktozes un 27±5 g L⁻¹ GOS. Skābās garšas intensitāte NOLATMFit5500 paraugam ievērojami atšķīrās ($p < 0.05$) un tika novērtēta ar 1.9 (no 12), bet pārējiem paraugiem tā svārstījās no

1.0 līdz 1.2. Sāļuma intensitāte paraugiem būtiski neatšķīrās ($p>0.05$), izņemot kontroles paraugu. Kopumā skābās un sāļās garšas intensitāte tika novērtēta zemāk kā 2, kas norāda uz mazu šo garšu ietekmējošo vielu klātbūtni paraugos. Pienskābes koncentrācija siera sūkalās ir ievērojami mazāka, salīdzinot ar biežpiena sūkalām, un ir diapazonā no 0.5 līdz 2.0 g L⁻¹ (Panesar *et al.*, 2007; Fischer & Kleinschmidt, 2015; Merkel *et al.*, 2021). Pēcgaršas intensitāte paraugos bija nozīmīga ($p<0.05$), visi paraugi tika novērtēti robežās no 6.6 līdz 7.2, bet kontroles 2.8.

Savukārt 7. tabulā ir redzams, ka paraugiem, kas iegūti no biežpiena sūkalu ultrafiltrāta, bija ievērojama salduma intensitātes atšķirība ($p<0.05$), turklāt kontrolei bija augstākais rādītājs 7.2 (no 12). Jānorāda, ka NOLATMFit5500 paraugam bija mazāka salduma intensitāte (2.5) un augstāka skābuma intensitāte (6.6). Visu paraugu sāļuma intensitāte būtiski neatšķīrās ($p>0.05$), to vērtējums bija no 6.1 līdz 6.5, salīdzinot ar kontroli (1.2 no 12). Paraugu pēcgaršas intensitāte parādīja, ka kontroles un NOLATMFit5500 paraugi (attiecīgi 2.8 un 3.3) savstarpēji neatšķīrās ($p>0.05$), arī Ha-Lactase 5200 un GODO-YNL2 paraugi (5.6 un 6.0) būtiski neatšķīrās ($p>0.05$).

7. tabula / Table 7

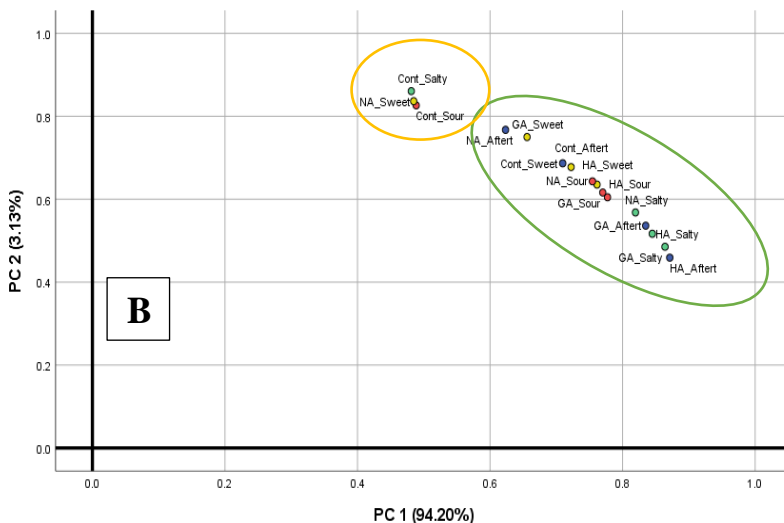
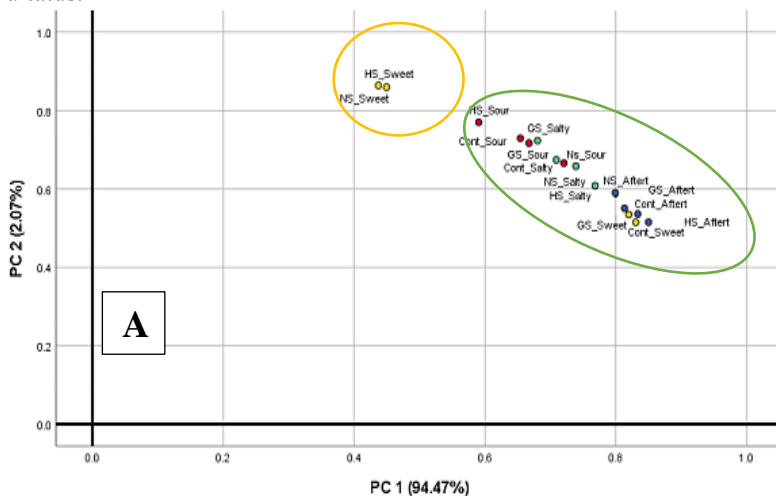
Hidrolizēto biežpiena sūkalu ultrafiltrāta paraugu sensoro īpašību intensitātes novērtējums / *Sensory attributes intensity of hydrolysed acid whey permeate samples*

Īpašība/Attribute	Kontrole/ Control	NOLA TM Fit 5500	Ha-Lactase 5200	GODO- YNL2
Saldā garša/ <i>Sweet taste</i>	7.2 ^a	2.5 ^c	4.3 ^b	3.9 ^{bc}
Skābā garša/ <i>Sour taste</i>	1.0 ^c	6.6 ^a	4.2 ^b	4.3 ^b
Sāļā garša/ <i>Salty taste</i>	1.2 ^b	6.2 ^a	6.5 ^a	6.1 ^a
Pēcgarša/ <i>Aftertaste</i>	2.8 ^b	3.3 ^b	5.6 ^a	6.0 ^a

Vērtības apzīmētas ar vienādu burtu katras rindas ietvaros būtiski neatšķiras ($p>0.05$) / *The values marked with the same letter within each row do not differ significantly ($p>0.05$)*

Viena no galvenajām paraugu atšķirībām bija lielā sāļuma un mazā salduma intensitāte (7. tabula). Faktori, kas to ietekmē ir sūkalu veids, pH un pievienotais 10% KOH daudzums. Biežpiena sūkalu ultrafiltrātu iegūst biežpiena un grieķu jogurta ražošanā, ar ultrafiltrāciju atdalot olbaltumvielu un tauku frakciju. Pienskābe un lielākā daļa minerālvielu pāriet filtrātā, kas ir zemā pH un sāļi skābās garšas cēlonis (Merkele *et al.*, 2021; Talebi *et al.*, 2020). Turklāt eksperiments ar NOLATMFit5500 enzīmu veikts pH 5.6±0.1, kas varētu skaidrot mazo salduma un lielo skābuma intensitātes rādītāju. Savukārt Ha-Lactase 5200 un GODO-YNL2 enzīmiem optimālais pH ir augstāks (6.5 – 8.0), kas samazina skābās garšas sajūtu, bet palielina pēcgaršu. Wen's *et al.* (2020) pētījumā norāda, ka K⁺ joni ir sāļās un rūgtās garšas veicinātāji. Pētījuma secinājumi izskaidro no

siera un biezpiena sūkalu ultrafiltrātiem iegūto paraugu sāļās garšas novērtējuma rezultātus.



Cont - Kontrole/; **NA** - NOLATMFit5500; **HA** - Ha-Lactase 5200; **GA** - GODO-YNL2 Control **NS** - NOLATMFit5500; **HS** - Ha-Lactase 5200; **GS** - GODO-YNL2

14. att. Galveno komponentu analīze, analizējot hidrolizēto A - siera un B - biezpiena sūkalu ultrafiltrāta paraugu sensoro īpašību intensitāti (● salda, ● skāba, ● sāļa un ● pēcgarša) (n = 36) / Fig. 14 Principal component analysis of the sensory attributes (● sweet, ● sour, ● salty and ● aftertaste) intensity of hydrolysed A – sweet and B – acid whey permeates samples (n = 36)

Galveno komponentu analīze (14. A attēlā) parādīja, ka pirmie divi PCA analīzes komponenti (PC1 un PC2) izskaidroja 96% sensoro īpašību novērtējuma variāciju starp kontroli un siera sūkalu ultrafiltrāta paraugiem. Pirmais komponents (PC1) izskaidroja 94% no datu variācijas, apvilkti ar zaļo krāsu, parādot, ka kopumā paraugu īpašību vērtējums ir diezgan līdzīgs. Savukārt otrais komponents (PC2) izskaidro 2% datu variācijas, apvilktas ar dzelteni krāsu, parādot, ka NOLATMFit5500 un Ha-Lactase 5200 paraugi uzrādīja visaugstāko saldās garšas intensitāti.

Savukārt 14. B attēla rezultāti parādīja, pirmie divi PCA analīzes komponenti (PC1 un PC2) izskaidroja 97% sensoro īpašību novērtējuma variāciju starp kontroli un biezpiena sūkalu ultrafiltrāta paraugiem. PC1 komponents izskaidroja 94% datu variācijas, apvilktas ar zaļo krāsu, bet PC2 komponents tikai 3% datu variācijas, apvilktas ar dzelteni krāsu. Zemākie vērtējumi bija kontroles paraugam sāļās un skābās garšas intensitātē, bet NOLATMFit5500 paraugam saldās garšas intensitātē.

Pēc laktozes hidrolīzes paraugus izomerizēja ar glikozes izomerāzi un koncentrēja līdz sausnai 70%. Vērtētāju grupa veica novērtēšanu pēc iepriekšaprakstītās metodikas.

8. tabulas rezultāti parādīja, ka starp paraugiem salduma, sāļuma un pēcgaršas intensitātē ir būtiskas atšķirības ($p > 0.05$). Salduma intensitātē tika novērotas statistiskas atšķirības. GODO-YNL2, NOLATMFit5500 un Ha-Lactase 5200 paraugiem vērtējums būtiski neatšķīrās ($p > 0.05$), arī GODO-YNL2 un kontroles paraugu vērtējums būtiski neatšķīrās ($p > 0.05$). Pēcgaršas intensitātes novērtējumā būtiski atšķīrās NOLATM Fit5500 paraugs ($p < 0.05$). Skābās garšas intensitātes vērtējumā paraugi būtiski neatšķīrās ($p > 0.05$).

8. tabula / Table 8

Divpakāpju fermentācijā iegūto siera sūkalu ultrafiltrāta sīrupu sensorās īpašības / The sensory properties of sweet whey permeate syrups made in two-stage fermentation

Īpašība/Attribute	Kontrole/ Control	NOLA TM Fit5500	Ha-Lactase 5200	GODO- YNL2
Saldā garša/ Sweet taste	7.4 ^b	9.2 ^a	9.3 ^a	8.4 ^{ab}
Skābā garša/ Sour taste	1.2 ^a	1.9 ^a	1.5 ^a	1.4 ^a
Sāļā garša/ Salty taste	2.4 ^b	2.2 ^b	2.9 ^a	3.1 ^a
Pēcgarša/ Aftertaste	3.7 ^b	4.7 ^a	3.9 ^b	3.8 ^b

Vērtības apzīmētas ar vienādu burtu katras rindas ietvaros būtiski neatšķiras ($p > 0.05$) / The values marked with the same letter within each row do not differ significantly ($p > 0.05$)

9. tabulas rezultāti parādīja, ka ar divpakāpju fermentāciju iegūtos paraugos nebija iespējams paaugstināt saldās garšas intensitāti

Divpakāpju fermentācijā iegūto biezpiena sūkalu ultrafiltrāta sīrupu sensorās īpašības / The sensory properties of acid whey permeate syrups made in two-stage fermentation

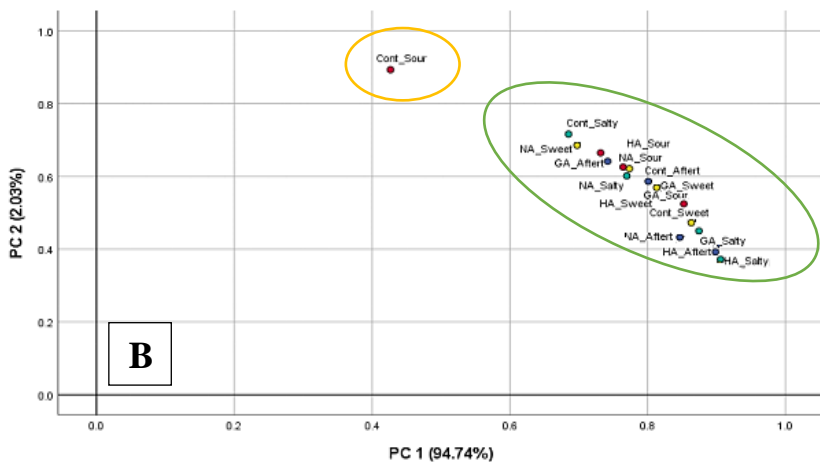
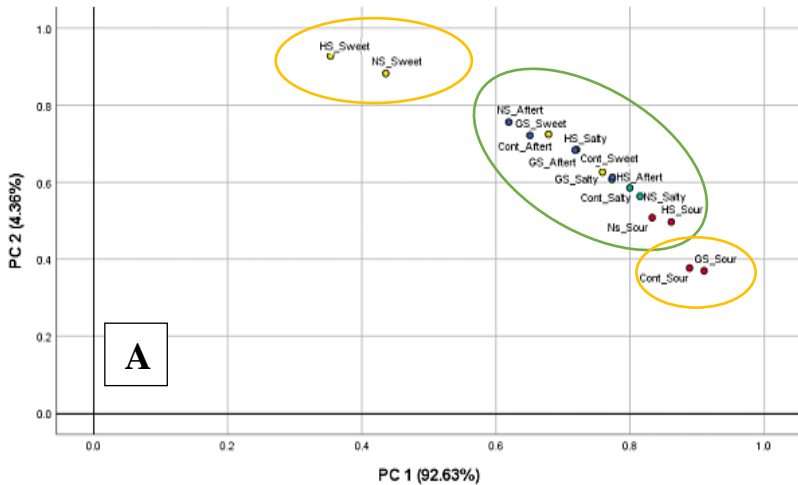
Īpašība/Attribute	Kontrole/Control	NOLA™Fit5500	Ha-Lactase 5200	GODO-YNL2
Saldā garša/ <i>Sweet taste</i>	7.6 ^a	4.2 ^b	4.5 ^b	3.4 ^c
Skābā garša/ <i>Sour taste</i>	1.5 ^c	3.2 ^b	3.9 ^b	5.1 ^a
Sālā garša/ <i>Salty taste</i>	2.4 ^c	5.5 ^b	8.7 ^a	8.1 ^a
Pēcgarša/ <i>Aftertaste</i>	3.7 ^c	8.1 ^a	8.7 ^a	5.1 ^b

Vērtības apzīmētas ar vienādu burtu katras rindas ietvaros būtiski neatšķiras ($p>0.05$) / The values marked with the same letter within each row do not differ significantly ($p>0.05$)

Kontroles parauga salduma intensitāte tika novērtēta ar 7.6 (no 12), kas šajā pētījumā bija visaugstākā. NOLA™Fit5500 un Ha-Lactase 5200 paraugu salduma intensitāte būtiski neatšķīrās ($p>0.05$), bet GODO-YNL2 paraugs tika novērtēts viszemāk 3.4 (no 12).

Galveno komponentu analīze (15. A attēlā) parādīja, ka pirmie divi PCA analīzes komponenti (PC1 un PC2) izskaidroja 97% sensoro īpašību novērtējuma variāciju starp kontroli un sīrupa paraugiem, kas iegūti no siera sūkalu ultrafiltrāta. PC1 komponents izskaidroja 92% datu variācijas, apvilktas ar zaļo krāsu, parādot tos paraugus, kuru novērtējums ir līdzīgs, bet PC2 tikai 4% datu variācijas, apvilktas ar dzelteno krāsu, norādot, ka šiem paraugiem ir izteikti atšķirīgs vērtējums. Pēc divpakāpju fermentācijas visaugstāk tika novērtēta NOLA™Fit5500 un Ha-Lactase 5200 paraugu saldās garšas intensitāte, bet kontroles un GODO-YNL2 paraugu skābās garšas intensitāte novērtēta viszemāk, norādot, ka skābā garša šiem paraugiem praktiski netika sajūta.

Savukārt galveno komponentu analīze (15. B attēlā) parādīja, ka pirmie divi PCA analīzes komponenti (PC1 un PC2) izskaidroja 97% sensoro īpašību novērtējuma variāciju starp kontroli un sīrupa paraugiem, kas iegūti no biezpiena sūkalu ultrafiltrāta. PC1 komponents izskaidroja gandrīz 95% datu variācijas, apvilktas ar zaļo krāsu, bet PC2 tikai 2%, apvilktas ar dzelteno krāsu. Zemākais novērtējums bija kontroles paraugam, kuram vērtētāji nesajūta izteiktu skābās garšas intensitāti, salīdzinot ar pētāmiem paraugiem, kuriem pēc divpakāpju fermentācijas skābā garša bija daudz izteiktāka.



Cont - Kontrole /; **NA** - NOLA™Fit5500; **HA** - Ha-Lactase 5200; **GA** - GODO-YNL2 Control **NS** - NOLA™Fit5500; **HS** - Ha-Lactase 5200; **GS** - GODO-YNL2

15. att. Galveno komponentu analīze, analizējot divpakāpju fermentācijā iegūto sīrupu (A - siera un B - biezpiena ultrafiltrātiem) sensoro īpašību intensitāti (● salda, ● skāba, ● sāļa un ● pēcgarša) (n = 30) / Fig. 15. Principal component analysis of the sensory attributes (● sweet, ● sour, ● salty, and ● aftertaste) intensity of syrups made in two-stage fermentation (A – sweet and B – acid whey permeates) (n = 30)

Pētījumā izmantotā glikozes izomerāze ir aktīva pH 7.5, tas nozīmē, ka paraugiem ir jāpievieno papildus 10% KOH šķīdums. K⁺ jonu koncentrācijas

palielināšanās rada spēcīgu sāļo, rūgto garšu un pēcgaršu. Viena no galvenajām biežpiena sūkalu pārstrādes problēmām ir to skābums, kurš pārstrādes procesos ir jāneitralizē. Šādā gadījumā tiek izmantots stiprs sārma šķīdums (nātrijs vai kālija hidroksīds), lai pēc iespējas mazāk to pievienotu sūkalām. Šī metode ietekmē sūkalu minerālvielu saturu un kavē atsāļošanu, padarot tehnoloģiju vēl neefektīvāku (Kravtsov *et al.*, 2020). Biezpiena sūkalu ultrafiltrāta pH palielināšana līdz 7.5 būtiski ietekmēja sīrupa sastāvu un sensorās īpašības. Sārma šķīdumu izmantošana ietekmē aminoskābju reaktīvās grupas, kā rezultātā mainās nekovalenti spēki (piemēram, van der Vālsa), elektrostatiskā mijiedarbība, hidrofobā mijiedarbība un ūdeņraža saite (Onwulata *et al.*, 2006). Tas izskaidro arī duļķu parādīšanos sīrupā, padarot to mazāk dzidru.

Paraugu sensorais novērtējums parādīja, ka divpakāpju fermentācija spēj palielināt sīrupa salduma intensitāti. Lai gan izomerizācijai ir dažas nepilnības, sīrupa dzidruma uzlabošanai ir nepieciešami papildus pasākumi, īpaši biežpiena sūkalu sīrupam. Salduma intensitātes novērtēšanas rezultāti siera sūkalu ultrafiltrāta paraugiem apliecina, ka šiem produktiem ir potenciāls ienākt pārtikas tirgū. Savukārt biežpiena sūkalu ultrafiltrāta sīrupu sensorais novērtējums liecina, ka tos nevarētu tieši lietot saldvielā un saldinātāju aizstāšanai. Šo sīrupu varētu iekļaut jaunu produktu ražošanā, to garšas diversificēšanai.

SECINĀJUMI

1. Iegūtie pētījuma rezultāti apstiprina izvirzīto hipotēzi: divpakāpju fermentācija palielina glikozes-galaktozes sīrupa salduma pakāpi.
2. Ultrafiltrāts nesatur augstas tūrbības laktozi, kas ietekmē laktozes hidrolīzes reakciju.
3. Kalcija joni inhibē *Kluyveromyces lactis* β -galaktozidāzes darbību, pretēji *Bacillus licheniformis* β -galaktozidāzei. Galvenie substrātu aktivatori analizētajiem enzīmiem ir kālijs un nātrijs joni.
4. Glikometru var izmantot kā rūfīnas ierīci hidrolizētās laktozes satura analīzei substrātā.
5. *Kluyveromyces lactis* un *Bacillus licheniformis* β -galaktozidāze spēja saglabāt aktivitāti kuņģa-zarnu trakta modeļvidē, uzrādot atšķirīgu laktozes hidrolīzes spēju no $57 \pm 4\%$ (NOLA™ Fit5500) līdz $63 \pm 4\%$ (Ha-Lactase 5200), pievienojot *in vitro* apstrādātu β -galaktozidāzi saturošu šķīdumu 1 mL L^{-1} .
6. Katram substrātam noteiktā koncentrācijā ir atšķirīgas fizikālās un ķīmiskās īpašības, kas ietekmē enzīma aktivitāti un glikozes, galaktozes un laktozes saturu.
7. Pētījums pierādīja, ka veiksmīgāk laktozes hidrolīze īstenojama siera un biežpiena sūkalu ultrafiltrātam ar sausu 20%, pievienojot 2.5 U ml^{-1} enzīma. Abiem substrātiem ir atšķirīgas fizikālās un ķīmiskās īpašības, kas ietekmē enzīma aktivitāti un radušos monosaharīdu saturu.

8. Divpakāpju fermentācijā fruktozes vairāk veidojas siera sūkalu ultrafiltrātā. Lielākais fruktozes saturs (48 ± 1 un 24 ± 1 g L⁻¹ attiecīgi siera un biezpiena sūkalu ultrafiltrātos) tika iegūts, izmantojot Ha-Lactase 5200 β -galaktozidāzi.
9. Eksperimenti pierādīja, ka iegūtās laktulozes saturs ir atkarīgs no pievienotās fruktozes daudzuma. Noteiktais laktulozes saturs siera sūkalu ultrafiltrātā bija robežās no 1 ± 0.2 līdz 54 ± 2 g L⁻¹ un biezpiena sūkalu ultrafiltrātā no 1 ± 0.1 līdz 17 ± 1 g L⁻¹.
10. Augstāko galakto-oligosaharīdu producēšanas spēju uzrāda GODO-YNL2 β -galaktozidāze. Biezpiena sūkalu ultrafiltrātā galakto-oligosaharīdu saturs svārstījās intervālā no 17 ± 1 līdz 51 ± 4 g L⁻¹, bet siera sūkalu ultrafiltrātā no 27 ± 2 līdz 66 ± 2 g L⁻¹.
11. Sensorā novērtējuma rezultāti parādīja, ka siera sūkalu ultrafiltrāta paraugos ir augstāka saldās garšas intensitāte.
12. Pētījumā noskaidrots, ka, izmantojot divpakāpju fermentāciju, ir iespējams paaugstināt no siera sūkalu ultrafiltrāta iegūtā glikozes-galaktozes sīrupa salduma intensitāti.

TOPICALITY OF THE RESEARCH

New methods and technologies for processing food by-products into valuable and functional products are becoming increasingly important. There are two main types of whey, sweet and acid, and researchers are constantly studying to get new information and acquire new knowledge. One way to process lactose in whey is the application of biotechnology, specifically using β -galactosidase, to hydrolyse lactose into monosaccharides. This is the first step in making glucose-galactose syrup. Some dairy manufacturers around the world today produce and offer a 70% glucose-galactose syrup made from sweet whey.

The hydrolysis of lactose in glucose and galactose is considered to be an excellent alternative to sucrose, as the resulting sugars are sweeter and can be used as additives for food and animal products production. Over the last two decades, this process has motivated scientists and manufacturers to conduct research and analyse its benefits (Das *et al.*, 2015).

There is a possibility to further increase the sweetness of the syrup by adding glucose isomerase, which converts glucose into fructose. It is important to emphasize that galacto-oligosaccharides are also formed during enzymatic reactions, which are especially valuable as prebiotics. In turn, there are methods to produce lactulose during the lactose hydrolysis adding a certain amount of fructose to the substrate. Lactulose adds value to the final product and has been shown to perform a number of biological activities.

Finally, the new syrup can be a great alternative with a high level of sweetness that could be used as a sweet substance for the manufacturing of food products, thus reducing the energetic value of the product.

The **aim** of the doctoral thesis was to improve the lactose hydrolysis process for obtaining glucose-galactose and oligosaccharide syrups.

The **hypothesis** of the doctoral thesis – the two-stage fermentation increases the sweetness of glucose-galactose syrup.

The hypothesis of the doctoral thesis has been confirmed by the defended thesis:

1. The presence of cations affects the β -galactosidase activity in the sweet and acid whey permeate.
2. The chemical composition and quality of whey affect the physical properties of lactose.
3. Enzymatic reactions affect the functional and sensory properties of syrups.

The research **objects** – sweet and acid whey permeates, glucose isomerase, commercial β -galactosidases and glucose-galactose syrup.

The following **tasks** were set to achieve the aim of the doctoral thesis:

1. To evaluate the effect of cation concentration to ensure the β -galactosidase activity in substrate.
2. To investigate the physical properties of whey lactose in order to better understand its behaviour.
3. To study the changes of monosaccharide concentration in the lactose hydrolysis, varying with the solids concentration of the substrates and enzyme units.
4. To assess the possibilities of glucose isomerase to increase the sweetness of glucose-galactose syrup.
5. To evaluate the sensory properties of the developed syrups.

The **novelty** of the doctoral thesis:

1. The study of the relationship of lactose hydrolysis process in the formation of galacto-oligosaccharides, including lactulose.
2. The combination of β -galactosidase and glucose isomerase increases the sweetness of glucose-galactose syrup.

The **economic** significance of the doctoral thesis:

1. The studies have shown the possibility to obtain syrup that can be used as sugar and sweeteners replacer in the food industry and to produce functional products.
2. A technological solution for hydrolysis of lactose is proposed, comprehensively evaluating the physical properties of lactose, fermentation parameters and whey composition.

APPROBATION OF THE RESEARCH

The research results have been published in 6 scientific articles including in SCOPUS and Web of Science databases and presented at 8 international scientific conferences in USA, Czech Republic, Estonia, Italy and Latvia (see the list on pages 5–7).

MATERIALS AND METHODS

Time and location of the research

Experimental work was conducted during the period from November 2016 to May 2021. Analyses and research were performed at the following institutions:

- 1) Faculty of Food Technology, Latvia University of Life Sciences and Technologies;
- 2) Institute of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Institute of Solid State Physics at the University of Latvia,
- 3) Dairy Innovation Institute, California Polytechnic State University;
- 4) J.S. Hamilton Baltic Ltd. Laboratory.

Description of materials

Sweet and acid whey permeates which were used for the experiments were kindly donated by local dairy manufacturers SC “Smiltēnes piens” and SC “Tukuma piens”. Table 1 represents the composition and pH of the permeates.

At the beginning of the experiment, the composition of permeates was analysed by MilkoScan™ Mars (Foss Analytical, Denmark) and pH by inoLab pH 7110, (WTW, Germany).

Other materials:

- Immobilized glucose isomerase was isolated from *Streptomyces murinus* and purchased from Sigma–Aldrich (Germany). The enzyme has a cylindrical shape, with an approximate 0.6–0.8 mm diameter and 1.4–1.8 mm length. According to the manufacturer the specific activity of glucose isomerase was more than 350 U g⁻¹, optimal media pH 7.5 and temperature 70 °C.
- Fructose from Sigma–Aldrich (Germany).
- Glucose – galactose syrup SC “Smiltēnes piens”.

Commercial β-galactosidases (see Table 2) were used for lactose hydrolysis.

During the research, the enzymes and products were stored at a temperature of +4 °C to keep the high activity and quality.

The structure of the research

The research work is structured in five stages (summarized in Table 3), in which each stage contributes to increasing the sweetness of the syrup.

In the **stage I** the physical and chemical properties of commercial β -galactosidases were analysed in detailed way:

- the effect of metal ions on enzyme activity (calcium, sodium, potassium and magnesium);
- study of lactose hydrolysis with GIT (gastrointestinal tract model) treated β -galactosidase;
- evaluation of the rapid methods for the determination of enzyme activity and lactose hydrolysis.

In the **stage II** the sweet and acid whey were used to evaluate the properties of the permeates.

Main tasks of this stage:

- crystallographic properties;
- thermal properties;
- lactose morphology.

Particular methods have been selected from scientific papers to be sure that the chosen methods are appropriate for the investigation of the effect on the physical state of lactose crystals in permeates, their glass transition properties and behaviour.

The first and second stages were designed to evaluate and analyse research object, these results contain significant information used in **stage III** activities.

In this stage, each hydrolyses parameter such as, medium pH, solids, enzyme units was carefully analysed and evaluated to modulate the most effective factors for glucose-galactose syrup production with the highest sweetness (see Figure 1).

Permeates were hydrolysed with a method which is practised on a commercial scale for glucose – galactose syrup production.

The permeates with different solids (20, 30 and 40%) and commercial enzyme units of 0.5, 2.5 and 5 U ml⁻¹ were selected for the experiment. A rotary vacuum evaporator was used to increase the solids in permeates. The variation in solids concentrations and enzyme units is necessary to evaluate the sugar content in the hydrolysis, to gain a better knowledge of the properties of commercial enzymes, and to understand which combination corresponds to the highest degree of lactose hydrolysis. In addition, this study provides valuable information on the profile of monosaccharides, including nutritional value of glucose-galactose syrup.

The effect of added fructose for lactulose synthesis was investigated in **stage IV**.

In this study was investigated:

- 1) the lactulose synthesis during lactose hydrolysis by adding fructose from 1 to 20 g to 100 mL permeate sample (see Figure 2).
- 2) two-stage fermentation, adding 1 g glucose isomerase to 100 mL permeate sample.

This stage provides valuable data on sugar profile which definitely gives significant information about the sweetness of the final product (see Figure 3).

In **stage V** the sensory evaluation was conducted in two parts:

- 1) sensory evaluation of hydrolysed sweet and acid whey permeates. Commercial glucose-galactose syrup was used as a control, the solids concentration was reduced to 20% by distilled water. The hydrolysed sweet and acid whey permeates were evaluated by 36 trained panellists using 12-point unstructured line scale (students and staff members of the Faculty of Food Technology, Latvia University of Life Sciences and Technologies).
- 2) sensory evaluation of syrups produced by two step fermentation. When hydrolyzed samples were isomerized, they were concentrated to solids content of 70%, and commercial glucose-galactose syrup was used as a control. Syrups were evaluated by 30 trained panellists using 12-point unstructured line scale (students and staff members of the Faculty of Food Technology, Latvia University of Life Sciences and Technologies).

Description of the methods of analysis used in the research

The equipment, methods of analysis and standards used to perform the research are summarized in Table 4.

Statistical analysis of data

Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three replicates for composition and analytical measurements. Statistical analyses were carried out using Two-Way ANOVA, One-Way ANOVA and Tukey tests. The level of significance of the obtained data is characterized by the value of p (if $p > 0.05$, the results do not differ significantly, if $p < 0.05$, the results differ significantly). All data were calculated in MS Excel 2019 software.

Sensory data were analysed using a principal component analysis (PCA) where the variables are sensory attributes and enzymes, as well as the data were also assessed by a Two-Way ANOVA. These statistical analyses were calculated with IBM SPSS 22.0 (SPSS Inc.).

RESULTS AND DISCUSSION

1. The impact of calcium, sodium, potassium and magnesium ions on β -galactosidase activity

The effect of ions on NOLA™ Fit5500 β -galactosidase activity is shown in Figure 4. NOLA™ Fit5500 β -galactosidase activity was stable until the concentration of metal ions did not exceed 10 mM. Starting from the concentration of 15 mM, changes in the activity of enzymes were observed. Enzymes started to become less active at the sodium (Na^+) concentration range of 15 to 50 mM and magnesium (Mg^{2+}) concentration range of 15 to 30 mM. Potassium (K^+) and calcium (Ca^{2+}) at the concentration range of 0 to 50 mM did not have a significant effect on enzyme activity. Similar research was done by

Juajun *et al.* (2011) where it was established that monovalent ions, such as Na⁺ and K⁺, showed activator effect on the hydrolysis of ONPG by *Bacillus licheniformis* β-galactosidase. In contrast, the addition of Ca²⁺ ions in the concentration range of 1 to 10 mM slightly activated the enzyme and this finding can be beneficial for lactose hydrolysis in milk and whey.

Metal ions affected GODO-YNL2 β-galactosidase (originated from *Kluyveromyces lactis*) activity differently, see in Figure 5. Potassium at the concentration range of 5 to 50 mM showed the highest results and was considered as an enzyme activator. In turn, Na⁺ ions influence on enzyme activity was gradual, the enzyme activity had increased with an increased Na⁺ concentration. In all measurements, Ca²⁺ ions showed the lowest results which is considered as an inactivator. The Mg²⁺ ions also worked as an enzyme inactivator at the concentration range of 30 to 50 mM.

Ha-Lactase 5200 β-galactosidase (originated from *Kluyveromyces lactis*) activity is differently affected by each metal ions. As shown in Fig 6 K⁺, Mg²⁺, and Na⁺ ions in the concentration range of 5 to 50 mM increased enzyme activity and all ions were considered as activators, whereas Ca²⁺ concentration from 10 mM decreased enzyme activity and started to work as an inactivator.

Several researches indicate that K⁺ and Na⁺ ions are known as activators which increase the hydrolysis activity of β-galactosidase originated from *Kluyveromyces lactis* (Adalberto *et al.*, 2010; Jurado *et al.*, 2004; Wojciechowska *et al.*, 2018). However, there is little information on the more detail description of the effect and impact of these ions on β-galactosidase activity (Rico-Rodríguez *et al.*, 2020).

The amount of macronutrients in permeates gives a better understanding of their effect on enzyme activity. Potassium predominates in all samples, suggesting that the presence of other elements (which could act as inactivators) would not affect β-galactosidase activity and that the degree of hydrolysis would remain high. One of the taste attributes that can be used to describe whey is salty. The macronutrient content given in Table 5 shows that the sodium and potassium contents are different. Both elements give a salty and bitter taste which is also described in the research of Chandrapala *et al.* (2015), and Frankowski *et al.* (2014).

2. The study of β-galactosidase stability under gastric intestinal model *in vitro*

The experiment was performed under *in vitro* conditions to determine a relative stability of the commercial β-galactosidase used in this regard.

The importance of this study is due to the limited information available in literature on *in vitro* studies of β-galactosidase, so it is important to evaluate the properties of this enzyme in such environment.

A significant difference was observed in the result of hydrolysis, both between enzymes ($p < 0.05$) and between different concentrations of the same enzyme ($p < 0.05$).

As it was shown in Figure 7, Ha-Lactase 5200 ($62.5 \pm 3.9\%$) and NOLA™ Fit5500 ($57.3 \pm 4.3\%$) β -galactosidases at concentration 1 mL L^{-1} showed stronger digestive resistance and higher yield of lactose hydrolysis. However, GODO-YNL2 β -galactosidase showed low hydrolysis yield at enzyme concentration 1 and 5 mL L^{-1} . These results can be explained by the temperature and pH variation during the gastric-intestinal track. The temperature for experiment was 37°C which was less effective for the GODO-YNL2 β -galactosidase (40°C), but for NOLA™ Fit5500 ($35\text{--}50^\circ\text{C}$) and Ha-Lactase 5200 ($35\text{--}45^\circ\text{C}$) β -galactosidases were within the optimal interval. At gastric phase, the pH of the medium was 2 but at the intestinal phase pH was 7. Enzymes of *Kluyveromyces lactis* origin (GODO-YNL2 and Ha-Lactase 5200) are active at pH range of 6.5 to 8.0, while the NOLA™ Fit5500 β -galactosidase of *Bacillus licheniformis* origin is active under slightly more acid conditions in the range of 5 to 7 pH. The research results of several articles (Dagbagli & Goksungur, 2008; Vidya *et al.*, 2014) showed that β -galactosidase activity and stability are influenced by the enzyme origin, growth conditions (temperature, pH, aeration, agitation, incubation time) and components present in the growth medium. Moreover, Vrese *et al.* (2001) concluded that the commercial β -galactosidase in combination with probiotic β -galactosidase is able to pass through gastric phase, as well as, intestinal phase. Therefore, based on the results of the experiment, the ability of the enzymes to retain their activity during *in vitro*.

The hydrolysis of lactose by *Bacillus licheniformis* and *Kluyveromyces lactis* β -galactosidases was significantly different ($p < 0.05$). A comparatively high hydrolysis was achieved with the NOLA™ Fit5500 and Ha-Lactase 5200 β -galactosidases at a concentration of 1 mL L^{-1} .

As shown in our results in Figure 8, the highest hydrolysis effect was achieved using 1 mL L^{-1} of β -galactosidase concentration instead of 5 mL L^{-1} . It should be noted that the study method was based on the ratio among food, digestive enzyme and stock solution intake. The findings show that low enzyme concentration is more likely to retain activity in the GIT environment. It should be noted that various enzymes were added in *in vitro* experiments, different environmental parameters and substance concentrations were provided, which also have the greatest influence on the activity and behaviour of β -galactosidase.

Kotz *et al.* (1994) had compared β -galactosidase activity in commercial unflavoured yoghurt and in high lactase yoghurt which was hydrolysed for 60 minutes at 37°C and pH 3.5. β -Galactosidase in high lactase yoghurt showed lower activity in acidic media than β -galactosidase in commercial yoghurt, which might be explained by the potential inactivation of β -galactosidase in GIT. The authors concluded that the high enzyme concentration and low media pH had a significant impact on β -galactosidase sensitivity and promoted its denaturation.

3. Physical properties of dehydrated whey permeate

Surface morphology of the dehydrated powders from 5% α -lactose monohydrate solution, sweet whey, and acid whey permeates, as well as α -lactose monohydrate crystals have been investigated using scanning electron microscopy. As it can be seen in Figure 9 B, C and D dehydrated powder of lactose and both permeates have an amorphous form of lactose. Gänzle *et al.* (2008) reported that during the spray-drying, evaporation of water occurs very rapidly and the viscosity of the solution increases as well, that is the reason why crystals fail to form and lactose is formed in an amorphous form. The crystalline form of α -lactose monohydrate crystals have *Tomahawk* crystals showing faceted structure (Wong & Hartel, 2014). However, the micrographs of different permeate powders were diverse. Spray-dried powder from 5% α -lactose monohydrate solution (Figure 9. B) and sweet whey permeate (Figure 9. C) had droplet surface of spherical shapes with a smooth surface, while the morphology of spray-dried acid whey permeate droplets in Figure 9 D showed that one part of the droplets surface had a shrunken appearance, another part has cracks or fractures and the other part was smooth. As shown in Table 1, acid whey had pH below 6 which could be the reason for the appearance of the droplet surface to be strongly affected.

4. Glucose isomerisation for increasing of syrup sweetness

To produce a sweeter syrup from whey permeates, the hydrolysed permeates were used as a feedstock for glucose isomerisation by glucose isomerase. The experiment was carried out using sweet and acid whey permeates with the initial lactose concentration $205 \pm 3 \text{ g L}^{-1}$ and $180 \pm 0 \text{ g L}^{-1}$, respectively. The data presented in Figure 10 show that content of fructose in sweet whey permeate samples was obtained within range of 43 ± 10 to $48 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$.

The data presented in Figure 11 shows the content of fructose after isomerisation in acid whey permeate samples was within the range of 19 ± 3 to $24 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$. The use of β -galactosidase in this study was limited because it is difficult to achieve a complete hydrolysis of lactose due to the side reaction (Andrade *et al.*, 2020). Comparing the amount of fructose between permeates, the results indicate that fructose formation was observed higher in sweet whey permeate than in acid whey permeate. The highest fructose amounts 48 ± 1 (Figure 10) and $24 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ (Figure 11) were obtained in the samples where permeates were hydrolysed using Ha-Lactase 5200 β -galactosidase, and 44 ± 2 (Figure 10) and $23 \pm 6 \text{ g L}^{-1}$ (Figure 11) using NOLATMFit5500 β -galactosidase. Moreover, permeate samples with GODO-YNL2 showed the lowest amounts of monosaccharides but the highest of lactose.

The galacto-oligosaccharide (GOS) content in the samples was also analysed and shown in Figure 12.

Overall, the obtained GOS yield in hydrolysed acid whey permeate varied in the interval of 17 ± 1 to 51 ± 4 g L⁻¹ but in sweet whey permeate from 27 ± 2 to 66 ± 2 g L⁻¹. Our experiment showed that GODO-YNL2 β -galactosidase has the highest activity of GOS production, but NOLATMFit5500 β -galactosidase the least activity. The yield of GOS is highly dependent on temperature, pH, reaction time, source of β -galactosidase, and the initial concentration of lactose. In addition, the transgalactosylation reaction may be intensified due to low water activity (Botvynko et al., 2019). Luzzi et al., (2020) used four commercial β -galactosidase preparations for lactose hydrolysis as well as for GOS production, and their results indicated that the lowest GOS yield 71 g L⁻¹ was obtained using NOLATMFit5500 β -galactosidase which is also in agreement with our results. In turn, Andrade et al. (2020) findings showed that, using GODO-YNL2 β -galactosidase for GOS synthesis in goat's milk, $5.9 \pm 1.0\%$ GOS was obtained, which is close to our results. Overall, these results emphasise the ability of each β -galactosidase to form GOS with different structures and the possibility to produce GOS with potentially different prebiotic properties (Corzo-Martínez *et al.*, 2013). Based on the origin of β -galactosidase, the enzyme which is obtained from *Kluyveromyces lactis* produces β -(1 \rightarrow 6) galactooligosaccharides mainly 6'-galactosyllactose, allolactose and 1-6- β -D-galactobiose but from *Bifidobacterium bifidus* primarily GOS is produced with a β -(1 \rightarrow 3) bond (Gänzle, 2012).

To determine the most productive β -galactosidase preparation for GOS synthesis in sweet and acid whey permeates, each GOS amount was expressed as percentage of total amount of GOS in sample.

As can be seen in Figure 13, each enzyme has a specific transgalactolytic activity. The GOSs are the short-chain carbohydrates that are composed of 2—20 molecules of galactose and one molecule of glucose (Tokošová *et al.*, 2015). All β -galactosidases produce mainly disaccharides (GOS2) (which could be galactobiose, allolactose) and trisaccharide (GOS3) (which could be 6' galactosyl lactose). A small concentration of tetrasaccharides (GOS4) can also be detected. All enzymes showed that in sweet whey permeate more GOS can be produced. The maximum yield of GOS2 was obtained in acid whey permeate by NOLATMFit5500 β -galactosidase $84 \pm 1\%$ and GOS3 by GODO-YNL2 and Ha-Lactase 5200 β -galactosidases 34 ± 1 and $37 \pm 4\%$, respectively. Comparing the GOS types, enzymes showed the tendency to produce large amount of GOS2 in each whey permeate. The lactose isomer, allolactose, is a disaccharide that is similar to lactose, where instead of β -1 \rightarrow 6 glycoside bond is β -1 \rightarrow 4 bond. The study revealed that the β -galactosidase has an additional role in bond modification (Otieno, 2010; Osman, 2016).

Fischer & Kleinschmidt (2015) reported that the transgalactosylation behaviour of β -galactosidase originated from *Kluyveromyces lactis* strongly

depends on the concentration of salts which initially is in whey and their ratio. A significant effect on enzyme activity can be observed in case of the addition of a 10% KOH solution, which was used to adjust the pH of the substrate, thus increasing K^+ concentration. The effect of metal ions on β -galactosidase activity is based mainly on ionic radius and the enzyme structure is also affected (Rajakala & Selvi, 2006).

5. The sensory evaluation of developed syrups

Sweet whey permeate samples with NOLA™Fit5500 and Ha-Lactase 5200 β -galactosidases were evaluated similarly at the score 8.6 (out of 12), which were significantly ($p<0.05$) sweeter compared to the control and GODO-YNL2 samples, see Table 6. This indicates, that based on the obtained results the concentration of solids used and enzyme units were effective to increase sweetness. Chromatographic results showed that the control contains $73\pm 3 \text{ g L}^{-1}$ glucose, $59\pm 1 \text{ g L}^{-1}$ galactose, $15\pm 4 \text{ g L}^{-1}$ lactose and $27\pm 5 \text{ g L}^{-1}$ GOS. Moreover, the sour taste intensity differed significantly ($p<0.05$) for the NOLA™Fit5500 sample and was rated at 1.9 (out of 12), while the other samples ranged from 1.0 to 1.2. Salty taste intensity did not differ significantly between hydrolysed samples ($p>0.05$) except for NOLA™Fit5500 sample. Overall, the sour and salty taste intensity was scored below 2 (out of 12), indicating a weak presence of this taste compounds in the samples. The concentration of lactic acid in sweet whey is significantly lower compared to acid whey and the range is 0.5 to 2.0 g L^{-1} (Panesar *et al.*, 2007; Fischer, Kleinschmidt, 2015; Merkel *et al.*, 2021). The difference in aftertaste was significant ($p<0.05$) and all hydrolysed samples were scored 6.6 to 7.2 but the control 2.8.

All acid whey permeate samples (Table 7), showed significant difference ($p<0.05$) in sweet taste intensity but the control has the highest score 7.2 (out of 12). It should be indicated that NOLA™Fit5500 sample has the lowest score (2.5) in sweet taste intensity and the highest score in sour taste intensity (6.6). The salty taste intensity of all hydrolysed samples was not significantly different ($p>0.05$) and scored from 6.1 to 6.5 compared to the control 1.2 (out of 12). Aftertaste intensity showed that the control sample and NOLA™Fit5500 sample were 2.8 and 3.3, respectively, and did not differ significantly ($p>0.05$) and Ha-Lactase 5200 and GODO-YNL2 samples were 5.6 and 6.0, respectively, and did not differ significantly as well ($p>0.05$).

The samples obtained from acid whey have a high salty and low sweet taste intensity. The factors which need to be specified are – the source of whey permeate, pH and the volume of added 10% KOH. Mainly acid whey permeate can be obtained from fermented milk products (cottage cheese, Greek yoghurt) and after ultrafiltration, protein and fat fractions are removed but lactic acid is untouched which is the reason of low pH and salty and acidic taste (Merkel *et al.*, 2021; Talebi *et al.*, 2020). The experiment with NOLA™Fit5500 β -galactosidase was carried out at pH 5.6 ± 0.1 which could explain the lowest mean

score in sweet taste and the highest in sour taste. Wen's *et al.* (2020) report has a summary of several researches where K^+ ions were described as a contributor to the salty taste. The findings of the report explain the results of the evaluation of salty taste of sweet and acid whey permeates.

Principal Component Analysis (PCA) in Figure 14. A showed that the first two components of the PCA analysis (PC1 and PC2) explained the 96% variation in sensory evaluation between control and sweet whey permeate samples. The first component (PC1) explained 94% of the data variation, showing that green-lined attribute scores of samples were quite similar. While the second component (PC2) explained only 2%, indicating that yellow-lined NOLA™Fit5500 and Ha-Lactase 5200 samples had the highest intensity of sweet taste.

In contrast, Figure 14 B results showed that the first two components of the PCA analysis (PC1 and PC2) explained the 97% variation in sensory evaluation between control and acid whey permeate samples. The first component (PC1) explained 94% of the data variation, showing that the green-lined attribute scores of samples were similar. While the second component (PC2) explained only 3%, indicating that yellow-lined samples had the lowest intensity of sweet taste NOLA™Fit5500 sample and salty and sour taste intensity control sample.

After hydrolysis, samples were isomerised with glucose isomerase and evaporated till solid concentration up to 70%. Panellists performed evaluation according to the previously mentioned methodology.

In Table 8 results showed that there were significant differences ($p < 0.05$) in sweet, salty taste and aftertaste. The statistical difference was observed in sweet taste intensity where GODO-YNL2 with NOLA™Fit5500 and Ha-Lactase 5200 samples were not significantly different ($p > 0.05$) and GODO-YNL2 with control samples were not significantly different ($p > 0.05$) either. In the evaluation of aftertaste intensity, NOLA™Fit5500 sample differed significantly from all samples ($p < 0.05$). In the evaluation of acid taste intensity, all samples showed that the evaluation did not differ significantly ($p > 0.05$).

The results in Table 9 showed that two-stage fermentation increases sweetness of samples. The sweet taste intensity of control sample was scored 7.60 (out of 12), which was the highest. The sweet taste intensity of NOLA™Fit5500 and Ha-Lactase 5200 samples was not significantly different ($p > 0.05$) 4.2 and 4.5, respectively, and GODO-YNL2 sample was scored at least 3.4 (out of 12).

The PCA in Figure 15 A showed that the first two components (PC1 and PC2) of the analysis explained 97% variation in the sensory evaluation between control and syrups obtained from sweet whey permeate. The PC1 explained 92% of the data variation, showing that green-lined attribute scores of samples are similar, while the PC2 explained only 4%, indicating that yellow-lined NOLA™Fit5500 and Ha-Lactase 5200 samples had the highest sweet taste

intensity, while the acid taste intensity of the control and GODO-YNL2 samples was evaluated the lowest, indicating that the acidity was practically not felt in these samples.

In contrast, PCA in Figure 15. B showed that the first two components (PC1 and PC2) of the analysis explained 97% variation in the sensory evaluation between control and syrups obtained from acid whey permeate. The PC1 explained approximate 95% of the data variation, showing that green-lined attribute scours of samples were quite similar. While the PC2 explained only 2%, indicating that yellow-lined control sample had the lowest score in the sour taste intensity. This shows that the permeate samples had a more notable sour taste after two-stage fermentation.

Glucose isomerise which was used in the study is active at pH 7.5, and this means that after hydrolysis an additional 10% KOH solution needs to be added to the samples. Therefore, the increase of K^+ ions concentration gives a stronger sour, salty taste, and aftertaste. One of the main problems for acid whey is its high acidity and for recycling processes whey should be neutralised. The common method is to use strong alkali solutions such as sodium hydroxide or potassium hydroxide. However, this approach affects the ionic composition of whey and neutralises desalination, making the technology even less efficient (Kravtsov *et al.*, 2020). The increase of pH to 7.5 in acid whey permeate samples made a significant impact on syrup composition and sensory properties. The use of strong alkali solutions affects the reactive groups of the amino acids, resulting in the changes of the noncovalent forces that influence bounding, such as van der Waals forces, electrostatic interactions, hydrophobic interactions, and hydrogen bonding (Onwulata *et al.*, 2006). This explains the appearance of white sediments in the syrup.

This research showed that sensory profile of two-stage permeate fermentation is effective and is able to increase the sweetness of syrup. Although isomerisation has some side effects, additional preparations are needed to improve the clarity of the syrup, especially in the case of acid whey syrup. The sweet taste scoring results of final syrups obtained from sweet whey permeate suggest that this product has the potential to enter the food market. However, the sensory results of acid whey permeate syrups show that they would be less likely as a sweet product. This syrup could be included in the production of new products to diversify their taste.

CONCLUSIONS

1. The results of the study confirm the proposed hypothesis: the two-stage fermentation increases the sweetness of glucose-galactose syrup.
2. Permeates do not contain lactose of high purity which, in turn, influences lactose hydrolysis reaction.

3. *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase was more strongly inhibited by calcium ions than *Bacillus licheniformis* β -galactosidase. The main activators in the substrates were potassium and sodium ions for all enzymes.
4. The glucometer can be used as a routine device for the analysis of amount of hydrolysed lactose in a substrate.
5. The study indicates that β -galactosidases originated from *Kluyveromyces lactis* and *Bacillus licheniformis* were able to retain their activity after GIT *in vitro* simulation, showing a difference in lactose hydrolysis from 57 \pm 4% (NOLA™Fit5500) to 63 \pm 4% (Ha-Lactase 5200) with the addition of an *in vitro* treated β -galactosidase at concentration 1 mL L⁻¹.
6. Each permeate at a certain concentration has different physical and chemical properties which influence enzyme activity and the glucose, galactose and lactose concentration in the hydrolysed permeates.
7. The most convenient hydrolysis can be obtained at total solids concentration 20% of permeate and 2.5 U mL⁻¹ of enzymes. Both substrates at a certain concentration have different physical and chemical properties which influence the enzyme activity and profile of final sugar outcome.
8. In two-stage fermentation, more fructose is formed in the sweet whey permeate. The highest fructose content (48 \pm 1 and 24 \pm 1 g L⁻¹ in sweet and acid whey permeates, respectively) was obtained using Ha-Lactase 5200 β -galactosidase.
9. The experiments showed that the concentration of lactulose depends on the amount of added fructose. The amount of lactulose in sweet whey permeate was within the range of 1 \pm 0.1 to 54 \pm 2 g L⁻¹ and in acid whey permeate it was 1 \pm 0.1 to 17 \pm 1 g L⁻¹.
10. The highest activity of GOS production was shown by GODO-YNL2 β -galactosidase, where the amount of GOS in isomerised acid whey permeate varied in the interval from 17 \pm 0.1 to 51 \pm 4 g L⁻¹ but in sweet whey permeate from 27 \pm 2 to 66 \pm 2 g L⁻¹.
11. The results of the sensory evaluation showed that the sweet whey permeate samples had a higher sweet taste intensity.
12. The study revealed that using two-stage fermentation is possible to increase the sweetness intensity of glucose-galactose syrup obtained from sweet whey permeate.

LITERATŪRAS SARAKSTS / BIBLIOGRAPHY

1. Adalberto, P. R. R., Massabni, A. C. C., Carmona, E. C. C., Goulart, A. J. J., Marques, D. P. P., Monti, R. (2010) Effect of divalent metal ions on the activity and stability of β -galactosidase isolated from *Kluyveromyces lactis*. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, 31(3), p. 143–150.
2. Andrade, B. C., Timmers, L. F. S. M., Renard, G., Volpato, G., de Souza,

- C. F. V. (2020) Microbial β -Galactosidases of industrial importance: Computational studies on the effects of point mutations on the lactose hydrolysis reaction. *Biotechnology Progress*, 36(4), p. 1–8.
3. AOAC (2000) Official method 998.04 neutral lactase (β -galactosidase) activity in industry-Dairy products. AOAC official methods of analysis (17th ed), Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, Chapter 33, p. 49–51.
 4. Botvynko, A., Bednářová, A., Henke, S., Shakhno, N., Čurda, L. (2019) Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial β -galactosidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(4), p. 762–766.
 5. Chandrapala, J., Duke, M. C., Gray, S. R., Zisu, B., Weeks, M., Palmer, M., Vasiljevic, T. (2015) Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *Journal of Dairy Science*, 98(7), p. 4352–4363.
 6. Dagbagli, S., Goksungur, Y. (2008) Optimization of β galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y8279 by response surface methodology, *Electronic Journal of Biotechnology*, 11, 4, p. 1–12.
 7. Das, B., Roy, A. P., Bhattacharjee, S., Chakraborty, S., Bhattacharjee, C. (2015) Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: Optimization using response surface methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 121, p. 244–252.
 8. Fischer, C., Kleinschmidt, T. (2015) Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15–22.
 9. Frankowski, K. M., Miracle, R. E., Drake, M. A. (2014) The role of sodium in the salty taste of permeate. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5356–5370.
 10. Gänzle, M. G. (2012) Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal*, 22(2), p. 116–122.
 11. GODO-YNL2 Lactase Product Information [online] [viewed on 21. September 2019]. Retrieved from <https://www.ulprospector.com/en/la/Food/Detail/3913/398667/GODO-YNL2-Lactase>
 12. ISO (2003) 4121:2003, Sensory analysis — Guidelines for the use of quantitative response scales. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
 13. Ha-Lactase 5200 Product Information 2014 [online] [viewed on 21. September 2019]. Retrieved from https://hjemmeriet.com/no/uploads/dokumenter/PI_GLOB_Ha-Lactase5200_450804_EN.pdf. Accessed 28.1.2018
 14. ISO (2010) 5546:2010 Caseins and caseinates — Determination of pH (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

15. ISO (2003) 2173:2003 Fruit and vegetable products — Determination of soluble solids — Refractometric method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
16. ISO (2009) 5764:2009 Milk — Determination of freezing point — Thermistor cryoscope method (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
17. ISO (2009) 8968-1:2002 Milk and milk products — Determination of nitrogen content — Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
18. Juajun, O., Nguyen, T.-H. H., Maischberger, T., Iqbal, S., Haltrich, D., Yamabhai, M. (2011) Cloning, purification, and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 645–654.
19. Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J. M. (2004) Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 33–40.
20. Kotz, C. M., Furne, J. K., Savaiano, D. A., Levitt, M. D. (1994) Factors Affecting the Ability of a High β -Galactosidase Yogurt to Enhance Lactose Absorption. *Journal of Dairy Science*, 77(12), 3538–3544.
21. Kougoulos, E., Marziano, I., Miller, P. R. (2010) Lactose particle engineering: Influence of ultrasound and anti-solvent on crystal habit and particle size. *Journal of Crystal Growth*, 312(23), 3509–3520.
22. Kravtsov, V., Kulikova, I., Mikhaylin, S., Bazinet, L. (2020) Alkalinization of acid whey by means of electro dialysis with bipolar membranes and analysis of induced membrane fouling. *Journal of Food Engineering*, 277, p. 1-12.
23. Lee, C. H., Kim, H. T., Yun, E. J., Lee, A R, Kim, S R, Kim, J. H., Choi, I. G., Kim, K. H. (2014) A novel agarolytic β -galactosidase acts on agarooligosaccharides for complete hydrolysis of agarose into monomers. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), p. 5965–5973.
24. Luzzi, G., Steffens, M., Clawin-Rädecker, I., Hoffmann, W., Franz, C. M. A. P., Fritsche, J., Lorenzen, P. C. (2020) Enhancing the sweetening power of lactose by enzymatic modification in the reformulation of dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 73(3), p. 502–512
25. Merkel, A., Voropaeva, D., Ondrušek, M. (2021) The impact of integrated nanofiltration and electro dialytic processes on the chemical composition of sweet and acid whey streams. *Journal of Food Engineering*, p. 298–304.
26. Minekus, M., Alvinger, M., Alvito, P, Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S., Weitschies, W. & Brodkorb, A. (2014) A standardised static *in vitro*

- digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), p. 1113–1124.
27. NOLA™Fit5500 Product Information 2017 [online] [viewed on 21. September 2019]. Retrieved from https://hjemmeriet.com/da/ChrHansen/Products/NOLA-Fit/PI_GLOB_NOLA_Fit5500_350502_EN.pdf. Accessed 28.1.2018
 28. Onwulata, C. I., Isobe, S., Tomasula, P. M., Cooke, P. H. (2006) Properties of Whey Protein Isolates Extruded under Acidic and Alkaline Conditions. *Journal of Dairy Science*, 89(1), p. 71–81.
 29. Osman, A. (2016). Synthesis of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides: Science and Technology. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*, p. 135–154
 30. Otieno, D. O. (2010) Synthesis of β -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial β -Galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), p. 471–482.
 31. Pandalaneni, K., Amamcharla, J. K. (2018) Evaluating the crystallization of lactose at different cooling rates from milk and whey permeates in terms of crystal yield and purity. *Journal of Dairy Science*, 101(10), p. 8805–8821.
 32. Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), p. 1–14.
 33. Rajakala P., Selvi, P.K. (2006) The effect of pH, temperature and alkali metal ions on the hydrolysis of whey lactose catalysed by β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal of Dairy Science*, p. 167-172.
 34. Rico-Rodríguez, F., Villamiel, M., Ruiz-Aceituno, L., Serrato, J. C., Montilla, A. (2020) Effect of the lactose source on the ultrasound-assisted enzymatic production of galactooligosaccharides and gluconic acid. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 104945.
 35. Talebi, S., Suarez, F., Chen, G. Q., Chen, X., Bathurst, K., Kentish, S. E. (2020) Pilot study on the removal of lactic acid and minerals from acid whey using membrane technology. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(7), 2742–2752.
 36. Tokošová, S., Hronská, H., Rosenberg, M. (2015) Production of galactooligosaccharides by commercial preparates of fungal β -galactosidase. *Acta Chimica Slovaca*, 8(2), p. 101–106.
 37. Vidya, B., Palaniswamy, M., Gopalakrishnan, V.K. (2014) Screening and optimization of β -galactosidase from fungal strains by using agro residues. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, p. 1809–1821.
 38. Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C. & Schrezenmeir, J. (2001) Probiotics compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, p. 421–429.
 39. Wen, X., Chen, A., Wu, Y., Yang, Y., Xu, Y., Xia, W., Chen, S. (2020)

- Comparative evaluation of proximate compositions and taste attributes of three Asian hard clams (*Meretrix meretrix*) with different shell colors. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 400–411.
40. Wojciechowska, A., Klewicki, R., Sójka, M., Grzelak-Błaszczyk, K. (2018) Application of Transgalactosylation Activity of β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for the Synthesis of Ascorbic Acid Galactoside. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(1), p. 386–400.
 41. Wong, S. Y., Hartel, R. W. (2014). Crystallization in Lactose Refining-A Review. *Journal of Food Science*, 79(3), p. 257–272.
 42. Žolnere, K., Ciproviča, I., Ķirse, A., Cinkmanis, I. (2018) A study of commercial β -galactosidase stability under simulated in vitro gastric conditions. *Agronomy Research*, p. 1555–1562.