

Hidroliza laktoze pomoću enzima β -D-galaktozidaze

Vesna Stehlik-Tomas, Slobodan Grba, Damir Stanzer, Vlatka Gulan-Zetić

Izvorni znanstveni rad – Original scientific paper

UDK: 637.345

Sažetak

*U ovom radu su ispitivani uvjeti hidrolize laktoze pomoću enzimskog preparata β -D-galaktozidaze, a svrha je - primjena sirutke u fermentativnim procesima s kvascem *Saccharomyces cerevisiae* za kombiniranu proizvodnju alkohola i prehrambenog kvasca. Enzimska hidroliza je provedena na različitim temperaturama, s različitim koncentracijama laktoze u podlozi i različitim količinama dodanog enzimskog preparata. Rezultati pokazuju da je maksimalni stupanj hidrolize postignut u podlozi koja je sadržavala 5-10 % laktoze s dodatkom 2 g/L enzimskog preparata na temperaturi od 40 °C.*

*Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae*, sirutka, hidroliza laktoze*

Uvod

Područje biokonverzije u biotehnologiji, u vremenu sve jače svjesnosti o zagađenju rijeka, jezera, vodotokova podzemnih voda i mora naše planete Zemlje - ima sve veće značenje. Procesom biokonverzije pojedini industrijski otpaci mogu se koristiti kao supstrati za neke mikrobne procese. Tako se mogu smanjiti ulaganja energije i novca u obradu otpadnih voda, a istovremeno dobiti korisni proizvodi. Posebno interesantna sirovina za mnoge biotehnološke procese svakako je sirutka, glavni nusprodukt mljekarske industrije. Njena visoka vrijednost BPK₅ od 35-45 kgm⁻³, koja je uglavnom posljedica visoke količine laktoze (oko 70 % suhe tvari sirutke), uzrokuje teška zagađenja okoliša ako se ispušta u vodotoke kao otpadna voda. Kako sirutka sadrži vrijedne organske supstancije (laktoza i bjelančevine, mineralne tvari i mnogi vitamini), značajno mjesto u nizu mogućnosti prerade imaju biotehnološki procesi jer se sirutka fermentacijama prevodi u kemikalije, goriva i ostale vrijedne produkte metabolizma mikroorganizama koji imaju sposobnost korištenja laktoze (Baković i Tratnik, 1979.). Međutim, na tržištu Europe, sirutka još uvijek nije dovoljno iskorištena u prehrambene

svrhe (Bird, 1996.). Glavni je nedostatak sirutke visoka koncentracija laktoze koju ne mogu razgraditi (metabolizirati) mnoge životinje i ljudi u starijoj životnoj dobi. Sadrži i veliku količinu vode, a u suhoj tvari je visok udio mineralnih tvari koje uzrokuju tehnološke probleme u preradi sirutke, čime se smanjuje ekonomičnost proizvodnje. Da bi sirutku mogli lakše koristiti u prehrambene i biotehnološke svrhe, potrebno ju je hidrolizirati do glukoze i galaktoze.

Najznačajniji biotehnološki proces korištenja sirutke kao osnovne sirovine je proizvodnja alkohola i prehrambenog kvasca pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Stoga je enzimska hidroliza laktoze na glukozu i galaktozu pomoću enzima -D-galaktozidaze važan preduvjet za korištenje kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u fermentacijskim procesima (Santos et al, 1998.).

Zato je svrha ovog rada bila proučiti kinetički model hidrolize laktoze s komercijalnim enzimom -D-galaktozidazom uzevši u obzir utjecaj glavnih varijabli na samu hidrolizu (količina enzima, supstrat, produkt, temperatura).

Materijali i metode

Enzimski preparat -D-galaktozidaza, izoliran iz kvasca *Kluyveromyces marxianus var. lactis* pod nazivom Maxilact L 2000 proizvođača "Gist-brocades", dobiven je posredstvom tvrtke Probiotik d.o.o. iz Zagreba. Podloge u kojima su vršene hidrolize imale su sastav prikazan u tablici 1.

Hidrolize su obavljene u termostatskoj komori BTES 224 i magnetskoj mješalici tip MM-540 (300⁰/min.) na temperaturama 35, 40 i 45⁰C. U svim podlogama održavan je pH na oko 6,8.

Hidroliza laktoze praćena je mjerenjem nastale glukoze kolorimetrijskom metodom Glukoza-PAP (Trinder, 1969.) na spektrofotometru kod valne duljine od 492-550 nm na 25-27⁰C. Koncentracija galaktoze proračunata je uz pretpostavku da 1 mol laktoze daje 1 mol glukoze i 1 galaktoze prema izrazu:

$$\text{mmol/L glukoze} = \frac{A_p}{A_{st}} \times 5,56$$

A_p – apsorbancija uzorka kod 500 nm

A_{st} – apsorbancija standarda [c (glukoze) =5,56 mmol/L] kod 500 nm

Stupanj konverzije laktoze u glukozu i galaktozu izračunat je prema izrazu:

$$Y = \frac{c(\text{glukoze}) + c(\text{galaktoze})}{c(\text{laktoze})}$$

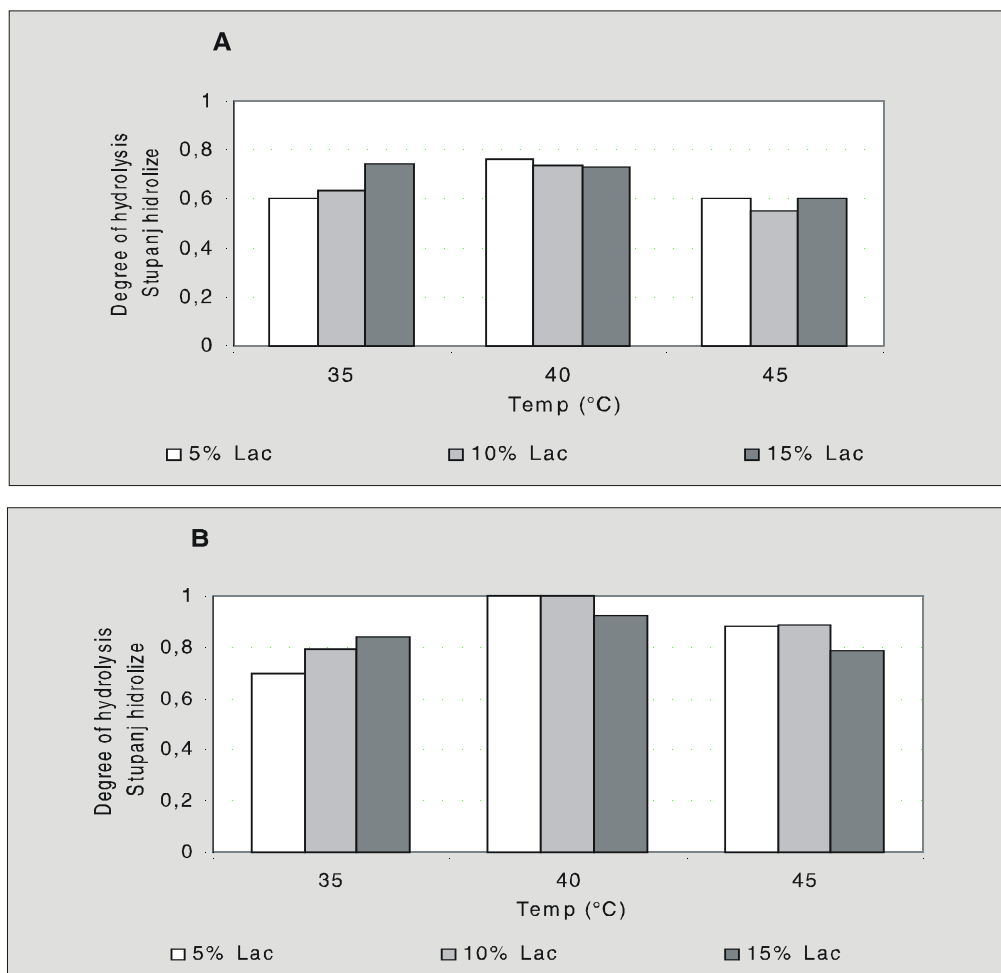
Tablica 1: Podloge za hidrolizu laktoze

Table 1: Media for lactose hydrolysis

Podloga Medium	Sastav Composition	Masena koncentracija (g/L) Mass concentration
Podloga 1 Medium 1	Laktoza Lactose â-D-galaktozidaza â-D-galactosidase	50 1
Podloga 2 Medium 2	Laktoza Lactose â-D-galaktozidaza â-D-galactosidase	100 2
Podloga 3 Medium 3	Laktoza Lactose â-D-galaktozidaza â-D-galactosidase	150 3

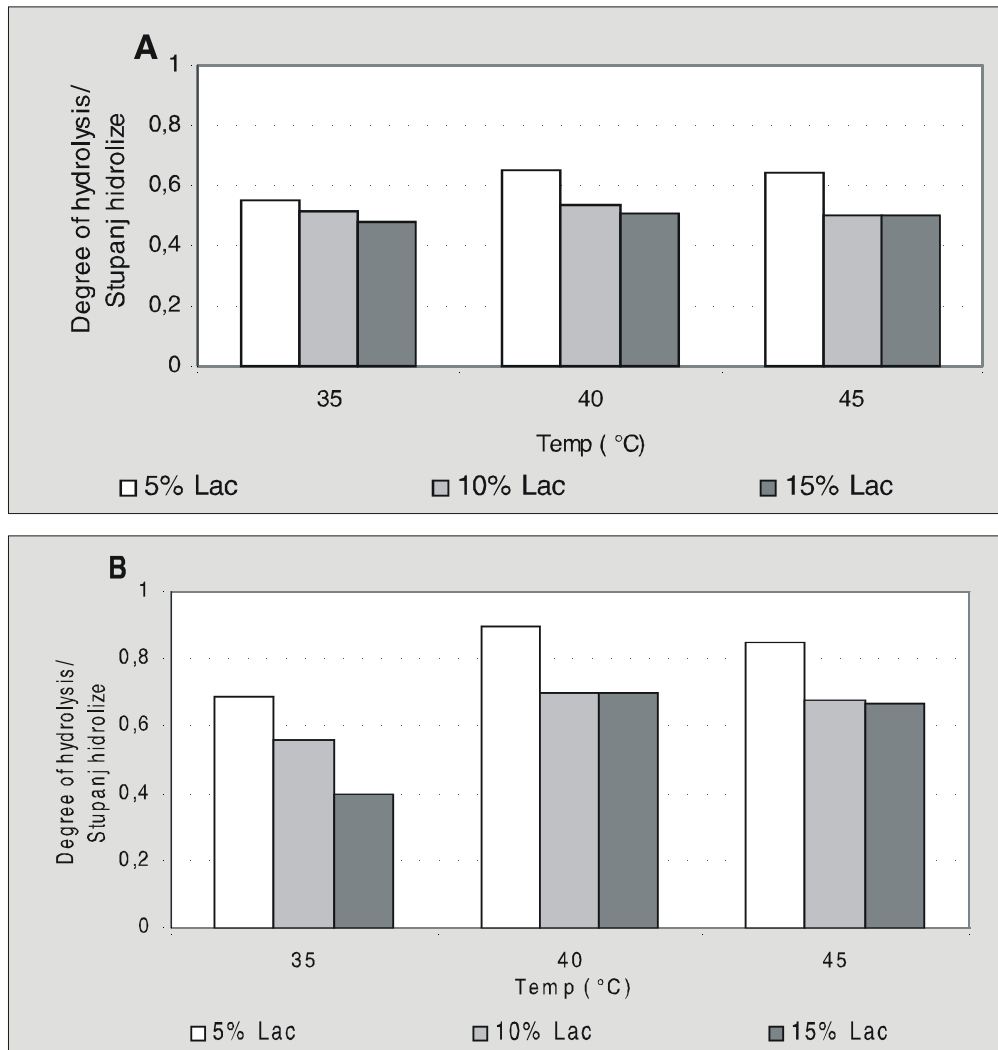
Rezultati i rasprava

Preliminarna istraživanja hidrolize laktoze pomoću enzima -D-galaktozidaze provedena su u svrhu utvrđivanja optimalne koncentracije dodanog enzima u podloge koje su sadržavale različite inicijalne količine laktoze, temperature koja pospješuje aktivnost enzima, te utjecaj miješanja podloge na uspješnost hidrolize laktoze do glukozu i galaktoze. Utjecaj temperature, količina dodanog enzima i miješanja na uspješnost hidrolize prikazuju slike 1 i 2.



*Slika 1: Utjecaj koncentracije enzima i temperature na stupanj konverzije laktoze (Lac) nakon 90 minuta miješanja podloge
A – dodatak 1 gL^{-1} enzimskog preparata
B – dodatak 2 gL^{-1} enzimskog preparata.*

*Figure 1: Influence of the enzyme concentration and temperature on lactose (Lac) conversion after 90 minutes of stirring
A – addition of 1 gL^{-1} enzyme preparation
B - addition of 2 gL^{-1} enzyme preparation.*

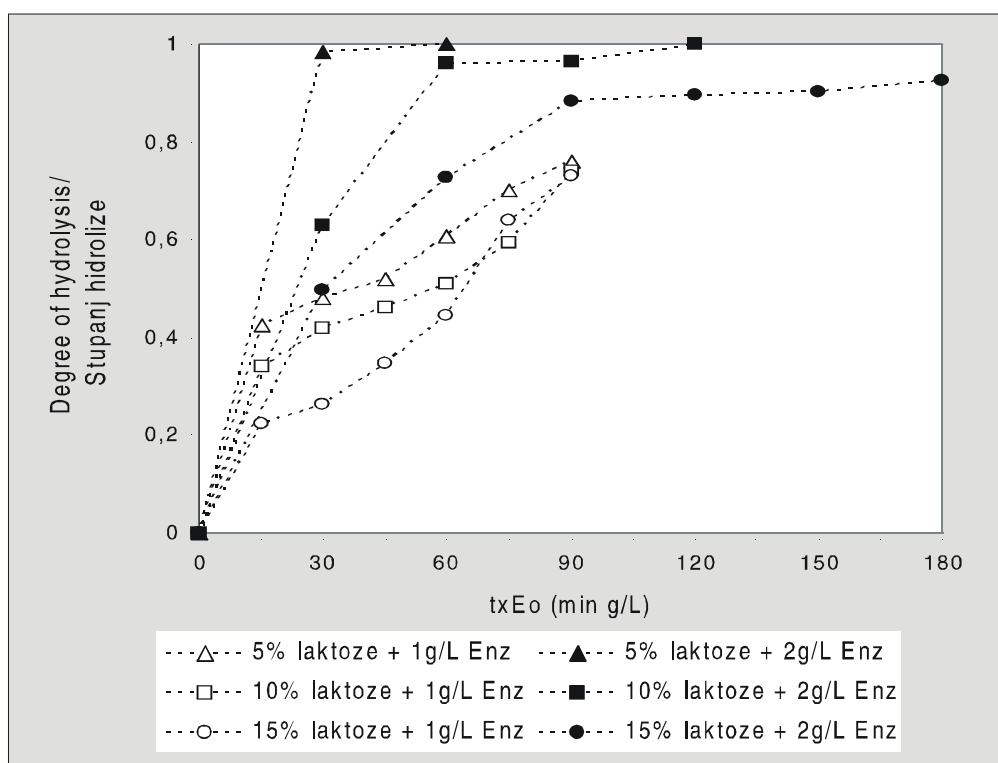


Slika 2: Utjecaj koncentracije enzima i temperature na stupanj konverzije laktoze (Lac) nakon 90 minuta bez miješanja podloge
 A – dodatak 1 gL^{-1} enzimskog preparata
 B – dodatak 2 gL^{-1} enzimskog preparata.

Figure 2: Influence of the enzyme concentration and temperature on lactose (Lac) conversion after 90 minutes without stirring
 A – addition of 1 gL^{-1} enzyme preparation
 B - addition of 2 gL^{-1} enzyme preparation.

Iz rezultata je vidljivo da veća koncentracija enzimskog preparata (2 gL^{-1}) uzrokuje značajno bolju hidrolizu laktoze. Potpuna hidroliza unutar 90 minuta postignuta je u uvjetima miješanja uz 2 gL^{-1} enzimskog preparata u podlogama koje su sadržavale $50\text{-}100 \text{ gL}^{-1}$ laktoze na 40°C . U uvjetima bez miješanja podloge, najbolja hidroliza je postignuta također na temperaturi od 40°C (50 gL^{-1} laktoze u podlozi). Ta istraživanja su bila neophodna da bi se provela hidroliza laktoze u optimalnim uvjetima.

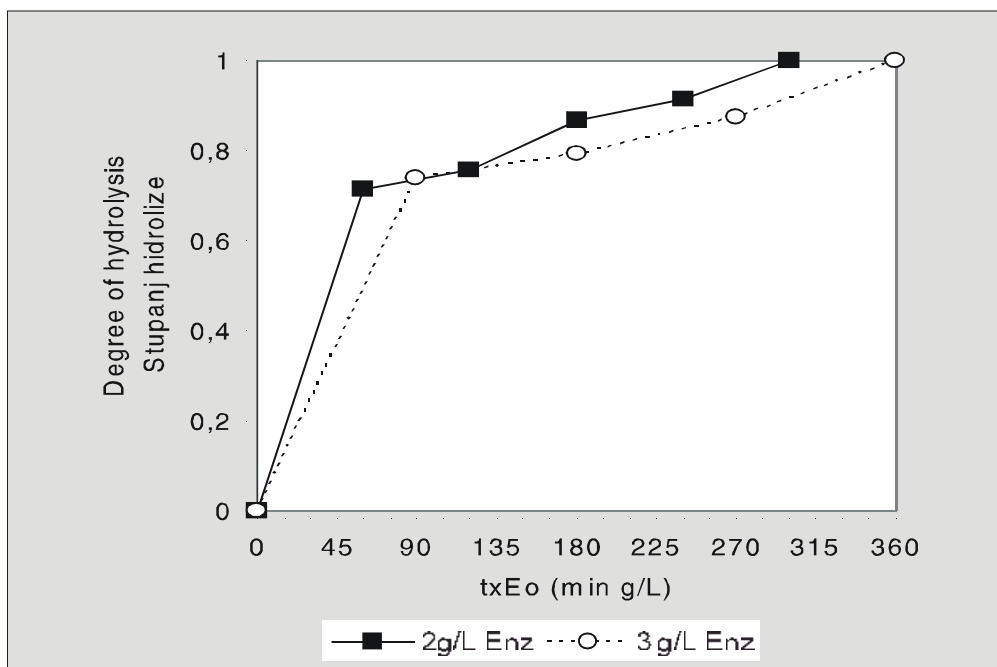
Slika 3 prikazuje dinamiku hidrolize laktoze tijekom 90 minuta u podlogama koje sadrže 5, 10 i 15 % laktoze uz dodatak 1 ili 2 g/L enzimskog preparata.



Slika 3: Utjecaj umnoška vremena hidrolize i početne koncentracije enzimskog preparata (txE_0) na stupanj hidrolize, uz miješanje, na 40°C .

Figure 3: Influence of the product of hydrolysis time and the initial concentration of the enzyme preparation (txE_0) on degree of hydrolysis with stirring at 40°C .

Stupanj hidrolize laktoze promatran u odnosu na umnožak vremena hidrolize i početne koncentracije dodanog enzimskog preparata (txEo), prikazan na slici 3, pokazuje u svim koncentracijama laktoze bolje rezultate enzimske reakcije s 2 gL^{-1} enzima dodanog u podlogu, nego u slučaju dodatka inicijalne koncentracije od 1 gL^{-1} enzimskog preparata. Također je vidljivo da je brzina enzimske reakcije, u slučaju ispitivanih početnih koncentracija laktoze, obrnuto proporcionalna početnom sadržaju laktoze. Iz ovih rezultata proizlazi da bi se mogla postići potpuna hidroliza laktoze i dodatkom od 1 gL^{-1} enzimskog preparata, ali kroz duže vrijeme hidrolize (5 sati). Dobiveni rezultati su u suglasju s nekim autorima.



Slika 4: Stupanj hidrolize laktoze nakon 150 minuta miješanjem, u otopini sa 150 gL^{-1} laktoze te 2 i 3 g/L enzimskog preparata, na 40°C .

Figure 4: Degree of lactose hydrolysis after 150 minutes with stirring in medium with 150 gL^{-1} of lactose, at 40°C . 2 and 3 gL^{-1} enzyme preparation were added

Santos, Ladero, Garcia-Ochoa (1998.) utvrdili su da obrnuto proporcionalni odnos vrijedi i pri manjim početnim koncentracijama laktoze u podlozi (25 gL^{-1}), dok Szcrodrak (2000.) navodi koncentraciju od 50 gL^{-1}

kao optimalnu. Guarda i sur. (1988.) utvrdili su da je maksimalna hidroliza laktoze postignuta u podlozi koja je sadržavala 58 gL^{-1} laktoze.⁻¹.

Budući je utvrđeno da se koncentracijom enzirnog preparata od 2 gL^{-1} dodanog u podlogu koja je sadržavala 150 gL^{-1} laktoze nije postigla željena hidroliza laktoze do glukoze i galaktoze tijekom 90 minuta, praćena je kinetika hidrolize laktoze tijekom 150 minuta (slika 4). U istom je vremenu provedena i hidroliza podloge koja je sadržavala 150 gL^{-1} laktoze uz dodatak 3 gL^{-1} enzirnog preparata.

Iz slike 4 je vidljivo da na hidrolizu laktoze uvelike utječe vrijeme hidrolize, dok koncentracija enzima veća od 2 gL^{-1} dodanog u podlogu sa 150 gL^{-1} laktoze nema većeg utjecaja. Potpuna hidroliza laktoze na $40 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom miješanja postignuta je unutar 150 min pri obje koncentracije enzima.

Zaključci

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je optimalna temperatura razgradnje laktoze pomoću enzirnog preparata -D-galaktozidaze 40°C . Optimalna količina dodanog enzirnog preparata je oko 2 gL^{-1} . Rezultati također upućuju na zaključak da je moguće postići hidrolizu laktoze s manjom količinom dodanog enzima (1 gL^{-1}), no vrijeme hidrolize bilo bi produljeno na 5 sati što bi ekonomski bilo prihvatljivo u pripremi sirutke za biotehnološku proizvodnju alkohola i prehrambenog kvasca pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Isto tako se mora napomenuti da se ovako hidrolizirana sirutka može upotrijebiti i u prehrambene svrhe kao aditiv.

HYDROLYSIS OF LACTOSE WITH β -D-GALACTOSIDASE

Summary

The conditions of lactose hydrolysis with enzyme preparation of β -D-galactosidase were investigated. The aim of this work was to consider the use of whey in fermentative processes with yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Enzymatic hydrolysis was conducted at different temperatures, with different lactose concentrations in medium and different concentrations of added enzyme. The results show that optimal temperature for hydrolysis was 40°C. The optimal amount of enzyme preparation was 2 gL⁻¹ in lactose medium with 5-10 % lactose.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, whey, hidrolisis lactose

Literatura

- AL-NATOUR, K.A., ABU-REESH, I.M. (1996.): Effect of substrate and product concentration on ethanol yield of Labaneh whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis*, *Dira. Natur. and Engineer. Sci.*, **23** (3), 336-350
- COMPAGNO, C., TURA, A., RANZI, B. M., MARTEGANI, E. (1993.): Bioconversion of lactose/whey to fructose diphosphate with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. and Bioengin.* **42**, 398-400
- GUARDA, M.A., MATELUNA, G., CASTRO, M. (1988.): Operational parameters of enzymatic hydrolyses of lactose in whey with *Saccharomyces lactis* lactase. *Alimentos.* **13**, 15-19
- PORRO, D., MARTEGANI, E., RANZI, B.M., ALBERGH, L. (1992.): Relating growth dynamic(s) of individual asynchronously growing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. and Bioeng.* **42**, 398-400.
- SANTOS, A., LADERO, M., GARCIA-OCHOA, F. (1998.): Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial technology*, **22**, 558-567

SCRZRODRAK, J. (2000.): Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**, 631-637

TAHOUN, M.K., EL-NEMR, T.M., SHATA, H. (1999.): Ethanol from lactose in salted cheese whey by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A-Food Research & Technology*. **208**(1), 60-64.

TRATNIK, Lj (1998.): Mlijeko-Tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

TRINDER P. (1969.): Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor, *Ann.Clin.Biochem* **6**, 24

Adrese autora – Authors addresses:

Dr.sc. Slobodan Grba, red.prof.
Dr.sc. Vesna Stehlik-Tomas, izv.prof.
Damir Stanzer, dipl. ing.
Vlatka Gulan-Zetić, dipl.ing.
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierrotijeva 6, 10000 Zagreb

Prispjelo – Received:

16. 09. 2001.

Prihvaćeno – Accepted:

15. 11. 2001.