



Nguyen Duc Quang^a – Szöllősi Attila^{1,a} – Nguyen Duc Vuong^{2,a}
 – Styevkó Gabriella^{3,a} – Bujna Erika^a – Rezessyné Szabó Judit^a
 – Hoschke Ágoston^a

■ ^a SZIE Sör- és Szeszipari Tanszék

Nguyen.Duc.Quang@etk.szie.hu | Bujna.Erika@etk.szie.hu | Szabo.Judit@etk.szie.hu | Hoschke.Agoston@etk.szie.hu

■ Jelenlegi munkahelyek: ¹Törley Pezsgőpincészet, ²Ho Chi Minh Ipari Egyetem, Vietnám, ³Fejér Megyei Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-biztonsági és Földhivatali Főosztály

Válogatás a SZIE Sör- és Szeszipari Tanszékén készült PhD-kutatások eredményeiből

A Sör- és Szeszipari Tanszék a Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar Biomérnöki és Folyamattervezési Kutatási Központ részeként látja el oktatási és kutatási feladatait. Kutatási tevékenységei az alkoholos fermentáció, biomérnöki upstream és downstream alap kutatások, megújuló energiaforrások, funkcionális élelmiszerek tématerületek köré összpontosulnak. Munkatársaink töreksenek a gazdaságos technológiai kialakításokra, a környezetvédelmi szempontok figyelembevételére, a feldolgozás során keletkezett melléktermékekben rejlő lehetőségek kiaknázására, valamint az egészségvédő, illetve betegségmegelőző élelmiszeripari termékek kifejlesztését célzó alap kutatások megvalósítására. E széles palettából néhány terület legújabb kutatási eredményeinek összefoglaló ismertetésére kerül sor a következőkben.

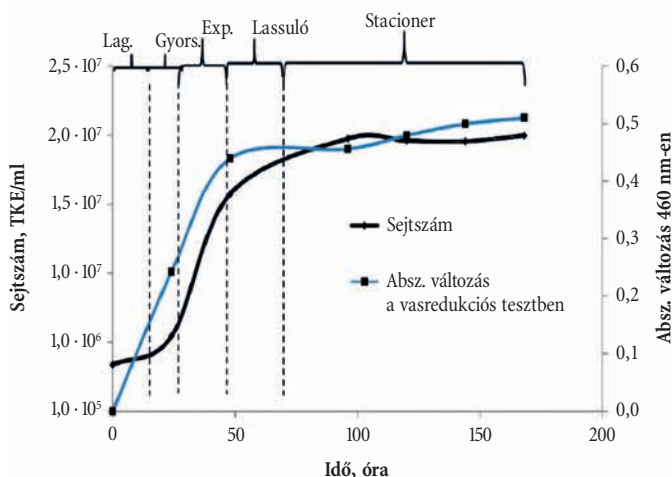
Mikrobiális üzemanyagcella teljesítményének növelése

A mikrobiális üzemanyagcella (MÜC) az üzemanyagcellák olyan speciális változata, ahol a mikroorganizmusok által katalizált oxidációs folyamatok hozzák létre az elektromos áramot. A szubsztátumként szolgáló szerves és szervetlen anyagokat az egyes mikrobák különféle anyagcsereutakon elektronokká, protonokká és szén-dioxidá alakítják [1]. A MÜC tartalmaz egy anód- és egy katódteret, amelyek protonszelektív membránnal (PEM) különülnek el egymástól. A mikroba által képzett elektronok különböző transzportfolyamatok révén a sejtfalon kívülre jutnak, majd az üzemanyagcella anódjára kerülnek. Az anódról az elektronok a katódra áramlanak, miközben külső fogyasztón haladnak keresztül, így létrehozva a felhasználható elektromos áramot. A protonok a szeparátoron keresztül jutnak a katódtérhez, ahol elektronokkal és oxigénnel együtt vízzé alakulnak. Szubsztátumként szolgálhatnak a különböző ipari vagy kommunális szennyvizek, a szerves hulladékok, amelyek kezelésére alkalmazott technológiák ugyan megfelelő hatékonyságúak, de energia- és erőforrásigényesek [2]. Így a mikrobiális üzemanyagcellák üze-

melletése hozzájárulhat a megnövekedett szennyvíz és szerves hulladék ártalmatlanításához, kezeléséhez, mely során az alkalmazott mikroorganizmusok a szerves anyagok lebontásával csökkentik a szennyvíz-kibocsátás káros hatásait, párhuzamosan az elektromos áram termelésével. A technológia áramforrásként számos más területen is használható, mint például a fejlett infrastruktúrától távol eső, nehezen megközelíthető helyeken (meteorológiai, szeizmológiai mérőműszerek, szondák). Az egyes speciális mikrobiális energiasejt-rendszerek alkalmazhatók bioszenzorokként is, például toxikus anyagok kimutatására. A szenzorok elektródjának felületére mikrobákat rögzítenek, melyek membránnal védettek. A membránon átdiffundáló toxikus anyagok jelenlétében a mikroba szaporodása gátlódik, és ennek következtében a termelt elektromos áram mennyisége csökken [2]. A technológia elterjedését nagymértékben gátolja a kis teljesítmény és a léptéknövelés nehézsége, kutatásaink ezen problémák megoldására irányultak.

Gyors módszer kidolgozása az exoelektrogén mikrobák kimutatására

A mikrobák MÜC-ben való alkalmazhatóságának kiválasztásánál fontos tényező az elektronátadási képesség, amelynek meghatározására Fe³⁺-redukción alapuló gyors módszert dolgoztunk ki [3]. A módszer alapelve, hogy a mikrobák anaerob körülmények között az anyagcserejük során képzett, redukált koenzimek regenerálódásakor keletkező elektronokat a sejtfal külső membrán-elektronláncán keresztül a Fe³⁺-ionoknak adják át. Ez az elektrontranszportlánc megegyezik a MÜC anódterében lejátszódó folyamattal [4]. A mikrobák tenyésztése során a tápközeget Fe³⁺-citrát-oldattal egészítettük ki, és a minták Fe³⁺-tartalmát ammónium-rodanid-oldattal határoztuk meg savanyított közegben (pH~2) fotometriáson, 460 nm-en mérve az abszorbanciát (**1. ábra**). Megállapítottuk, hogy a vizsgált *Geobacter* és *Shewanella* törzsek – *Geobacter sulfurreducens* DSMZ 12127, *Geobacter toluenoydans* DSMZ 19350, *Geobacter metallireducens* DSMZ 7210, *Shewanella algae* DSMZ 9167, *Shewanella xiamenensis* DSMZ



1. ábra. *Saccharomyces cerevisiae* szaporodási és vas(III)-redukciós tulajdonságai

22215, *Shewanella japonica* DSMZ 15915, *Shewanella woodyi* DSMZ 12036 – mindegyike rendelkezik elektrontermelő kapacitással mediátor alkalmazása nélkül is. Megfigyelhető továbbá, hogy az extracelluláris elektronok termelése szorosan kapcsolódik a szaporodáshoz (elsődleges anyagcseretermék), ugyanakkor a beoltási sejtkoncentráció is jelentősen befolyásolja a mikroba Fe^{3+} -redukcióját. Szoros lineáris korreláció mutatható ki 10^6 TKE/ml vagy ennél nagyobb sejtkoncentráció esetén a fajlagos elektromos áramtermelés és a mikroba általi Fe^{3+} -redukció között, amely a következő egyenlettel írható le:

$$z = 46,04 x + 4,17,$$

ahol z : fajlagos elektromos áramerősség (mA/m^2),

x : a 460 nm-en mért abszorbania változása.

Az alkalmazhatóság egyik fontos szempontja továbbá, hogy képes-e a kiválasztott mikrobakultúra elektrokémiai közvetítőket (mediátorokat) termelni. A mediátorok lehetnek konduktív fehérjék vagy flavin típusú vegyületek, amelyek vizsgálatához a *Shewanella xiamenensis* fajt választottuk. A vizsgálatok során arra jutottunk, hogy anaerob tenyésztési körülmények között az extracelluláris fehérjetartalom nagyobb volt, valamint a fehérjék vezetőképessége ($0,0267 mS/10^7 TKE$) is jelentősen meghaladta az aerob minták elektromos vezetőképességét. Ugyanez mondható el a fermentlé flavintartalmáról is ($8,38 \pm 0,05 \mu g/10^7 TKE$), ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a flavinvegyületeknek jelentős hatása van a mikrobák elektronláncának kialakításában. Oldott oxigén jelenlétében a terminális oxidáció a sejten belül végbemegy, így nem szükséges a mikrobáknak mediátorvegyületeket szintetizálni. Megállapítottuk továbbá, hogy a mikroba elektromos áramképzése fokozható exogén riboflavin adagolásával.

Elektródok fejlesztése a MÜC-teljesítmény növelésére

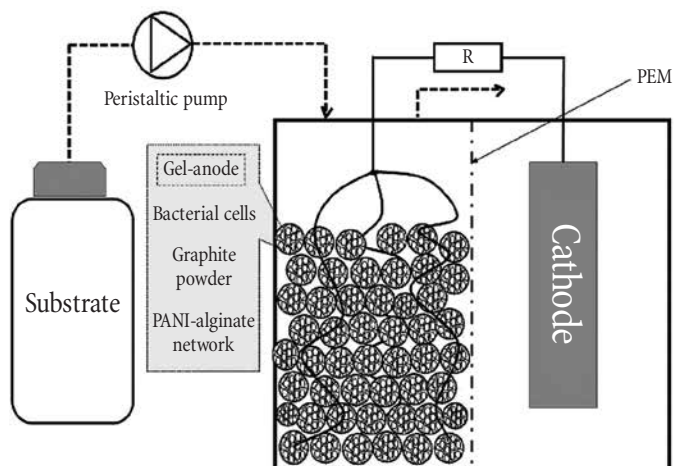
A mikrobiális üzemanyagcella teljesítményének növelésében meghatározó tényező az elektródok kialakítása, így mind az anód, mind a katód fejlesztésére fókuszáltunk.

Az anód esetében kedvező tulajdonságokkal rendelkező elektromosan vezetőképés gél alkalmaztunk. E gél előnye, hogy nagy a fajlagos felülete, térbeli hálózata miatt a cella teljes térfogata kihasználható, továbbá a gélmátrix védettséget biztosít a befertőződés ellen és lehetőséget nyújt a rendszer félfolytonos, illetve folytonossá tételére.

A vezetőképés gél létrehozásához alginát-polianilin kopolimert

és grafitport használtunk [5]. A polianilin (PANI) és a grafitpor egyidejű alkalmazása szignifikánsan megnövelte az elektród vezetőképességét. 0,01 g/ml PANI és 0,03 g/ml grafitpor együttesen 22-szeres vezetőképesség-növekedést okozott, míg további koncentráció-növelés (0,05 g/ml grafitpor és 0,02 g/ml PANI koncentráció) 105-szörös elektromos vezetőképesség-változást ($3,4 S/mm$ -ről $366 S/mm$ -re) eredményezett. A vezetőképességet növelő anyag koncentrációjának további növelése a gél szerkezet stabilitásának, flexibilitásának jelentős csökkenését okozta.

Az ily módon létrehozott vezetőképés gélanódba rögzítettük a *Shewanella algae* DSMZ 9167 törzset, s ezzel hoztuk létre az új-fajta bioanódot (2. ábra). A MÜC működtetése mind szakaszos, mind fél-folytonos és folytonos üzemben megvalósult. Megállapítottuk, hogy szakaszos üzemben 0,02 g/ml PANI és 0,05 g/ml grafitpor hozzáadása háromszorosára növelte a MÜC elektromos feszültségét (0,17 V-ről 0,44 V-re), és több mint hétszeresére a fajlagos teljesítményt ($1,45 W/m^3$ -ről $9,86 W/m^3$ -ra).



2. ábra. Új bioanódot tartalmazó kétkamrás mikrobiális energia-cella sematikus ábrázolása

Félfolytonos üzemmódban a beoltást követő időintervallumban az áramtermelés folyamatosan növekedett. Miután a teljesítmény elérte a maximumát ($7,88 W/m^3$), az áramtermelés gyorsan csökkent a szubsztrátumfogyás hatására. Az újabb tápanyaghozzáadás a mikrobiális üzemanyagcella elektromos áramtermelését ismét megnövelte. Folytonos üzemmódban is működtetjük a gélelektrodos MÜC-öt. Azt tapasztaltuk, hogy a betáplálási sebesség 0,5 ml/órától 3 ml/óra-ra való növelése az elektromos áramképzés maximumát ($7,92 W/m^3$) eredményezte, és ez az érték állandó maradt a mérés végéig (3 napig). A betáplálási térfogatáram további emelése már nem növelte jelentősen az elektromos áramtermelést, azonban a maximális teljesítmény hamarabb volt elérhető.

A MÜC működtetése során a gélek mikroba-visszatartása megfelelő volt, nem tapasztalható a baktérium sejtek kimosódása. A létrehozott új MÜC-rendszer tehát lehetőséget nyújt folytonos technológia kialakítására is, továbbá védelmet nyújt a befertőződés ellen.

A hatékonyság és gazdaságosság fokozása céljából az igen költséges platina- vagy nemesfém-alapú katalizátor helyett költség-hatékonyabb rézelektrodra galvanizált nikkelt alkalmaztunk. A létrehozott katód-katalizátor konstrukció megfelelően működött egykamrás mikrobiális üzemanyagcella-rendszerben. Bár a termelt elektromos áram mennyisége még nem érte el a nemesfém katalizátorok esetében kapott eredményeket – a legnagyobb fe-



szültség 330 mV volt, 90 mW/m² fajlagos teljesítmény mellett –, a fajlagos költségeket tekintve kedvezőbb lehet ez a kialakítás.

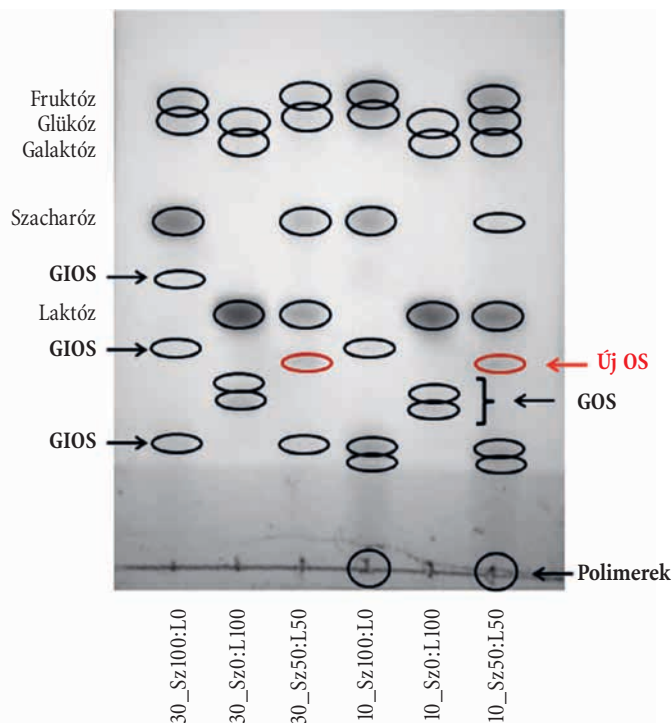
Oligoszacharidok szintézise

Az oligoszacharidok a szénhidrátok egyik fontos csoportja, melyek meghatározó szerepet játszanak a biológiai rendszerekben, részt vesznek különböző felismerési folyamatokban, nagy szerepük van a sejtek szervezési és védelmi mechanizmusában, továbbá kedvező fiziko-kémiai, fiziológiai és technológiai tulajdonságaik miatt az élelmiszeriparban is széleskörűen alkalmazzák őket. Egyes oligoszacharidokat az emésztőrendszer enzimej nem képesek lebontani, így a vastagbélbe eljutva ezek kedvezően támogatják az itt élő jótékony hatású mikroorganizmusok szaporodását, illetve aktivitását. E prebiotikus hatású oligoszacharidokat funkcionális élelmiszerek összetevőjeként széleskörűen alkalmazzák. Előállításuk történhet fizikai, kémiai és enzimes úton egyaránt. A fizikai és kémiai előállítással szemben az enzimes módszerek nagy előnye, hogy a régió- és sztereospecifitásnak köszönhetően szabályozható a termékspektrum, minimális a melléktermék képződés lehetősége, emellett változatos reakciókörülmények között is megvalósítható a biokonverzió. Az oligoszacharidok enzimes előállítása kivitelezhető reverz hidrolízis vagy transzglykolizációs reakciókkal egyszerű cukrokból (pl. szacharóz, laktóz, maltóz, glükóz), továbbá polisacharidok kontrollált hidrolízisével (pl. keményítő, inulin, xilán) [6]. Ezekhez a folyamatokhoz az enzimek két fő csoportját alkalmazzák: a glikoziltranszferázokat és a glikozidázokat. Annak érdekében, hogy a reverz hidrolízis során a reakció egyensúlyát a termékképzés irányába fordítsák, különböző módszereket alkalmaznak. A legelterjedtebb ezek közül a hidrolízisstermékek (pl. monoszacharidok) magas koncentrációban történő alkalmazása, illetve a hőmérséklet emelése (50–60 °C), amellyel a folyamat felgyorsítható [7].

Bifidobacterium eredetű enzimpreparátum

Az elmúlt években új kutatási irány jelent meg, amely a probiotikus baktériummal történő prebiotikus szénhidrátok szintézisét, valamint azok együttes alkalmazását (integrált szinbiotikum) célozza. Fermentációs tesztekkel bizonyították, hogy a probiotikum eredetű enzimmal szintetizált szénhidrátokon a célmikroorganizmusok jobban szaporodnak, mint a kereskedelmi forgalomban kapható prebiotikus szénhidrátokon [8, 9]. Kutatómunkánk során probiotikus *Bifidobacterium* eredetű enzimpreparátumok transzglykolizációs és reverz hidrolízis aktivitásának tanulmányozását céloztuk meg, az oligoszacharid-szintézis lehetőségeinek feltárására. Vizsgálatainkat mind mono-, mind biszubsztrátum-rendszerek kialakításával valósítottuk meg. Ehhez *Bifidobacterium longum* Bb-46 eredetű, β -galaktozidáz aktivitású enzimpreparátumot állítottunk elő és alkalmaztunk. Laktóz-, laktulóz-, maltóz- és szacharóz-szubsztrátumokon is detektáltuk oligoszacharidok képződését 6,6 pH-jú közegben, 40 °C hőmérsékleten, 30 g/100 ml szénhidrát-koncentráció mellett. Biszubsztrátum-rendszerek kialakítása esetén a laktózt és a laktulózt kombináltuk maltóz és szacharóz szénhidrátokkal 1:1 arányban. Megállapítottuk, hogy a monoszubsztrátumokhoz képest a laktulóz:szacharóz és laktóz:szacharóz biszubsztrátum-rendszerekkel fokozható az oligoszacharid-képzés. A laktóz:szacharóz és laktóz:maltóz biszubsztrátum-rendszerekben az optimális szubsztrátumarány és szubsztrátum-koncentráció: 61:39 és 25 g/100 ml, illetve 33:67 és 40 g/100 ml volt. Mindkét biszubsztrátum-rendszer alkalmazásával a monoszubsztrátumok esetében detektált termékektől el-

térő retenciójú terméket azonosítottunk vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel (3. ábra). A szénhidrát-összetétel alakulásából következtethető, hogy az új termékek transzgalaktozilációs reakcióval jöttek létre, amelyben a laktóz donorként, a szacharóz vagy a maltóz akceptorként szerepelt.



3. ábra. Szénhidrát-összetétel *Bifidobacterium longum* eredetű preparátum által, a laktóz:szacharóz biszubsztrátummal katalizált transzglykolizációs reakció 72. órájában

(paraméterek: pH: 6,6; 40 °C; szubsztrátum-koncentráció: 10 g/100 ml, 30 g/100ml, szacharóz:laktóz arányok: 100:0, 50:50, 0:100) (30_Sz100:L0: 30 g/100 ml szacharóz; 30_Sz0:L100: 30 g/100 ml szacharóz; 30_Sz50:L50: 15 g/100 ml szacharóz; 15 g/100 ml laktóz; 10_Sz100:L0: 10 g/100 ml szacharóz; 10_Sz0:L100: 10 g/100 ml laktóz; 10_Sz50:L50: 5 g/100 ml szacharóz; 5g/100 ml laktóz)

Megállapítottuk, hogy szacharózt alkalmazva 30 g/100ml koncentráció esetében háromféle, 10 g/100 ml szubsztrátum koncentráció esetében négyféle oligoszacharid, valamint polimerek szintetizálódtak. Csak laktózt alkalmazva szubsztrátumként, kétféle oligoszacharid termék állítható elő. A két szubsztrátumot együtt alkalmazva eltérő retencióval rendelkező oligoszacharidot detektáltunk, amely 30 g/100 ml szubsztrátum-koncentrációnál már a transzfer-reakció fő terméke volt. A biokonverzió során csak fruktóz és glükóz keletkezett, így feltételezhető, hogy transzgalaktozilációs reakcióval keletkezett az új szénhidrát termék. Tehát a *Bifidobacterium longum* Bb-46 eredetű enzimpreparátum β -galaktozidáz-aktivitása révén képes a laktózmolekulában lévő galaktózt a szacharózra átvinni.

Bifidobacterium eredetű α -glükozidáz enzim esetén is bizonyították, hogy transzglykolitikus aktivitással is rendelkezik, ennek köszönhetően felhasználható új glikozidos kötések létrehozására a hidrolizáló folyamat helyett [10]. Ennek a ténynek ismeretében *Bifidobacterium lactis* Bb-12 α -glükozidáz enzimét is vizsgáltuk oligoszacharid-szintézis szempontjából.

Az α -glükozidáz-tartalmú enzimpreparátum transzglykolizációs aktivitását α -glükozidos kötést tartalmazó maltózsusztrátum felhasználásával tanulmányoztuk. Vizsgáltuk a szubsztrátum-

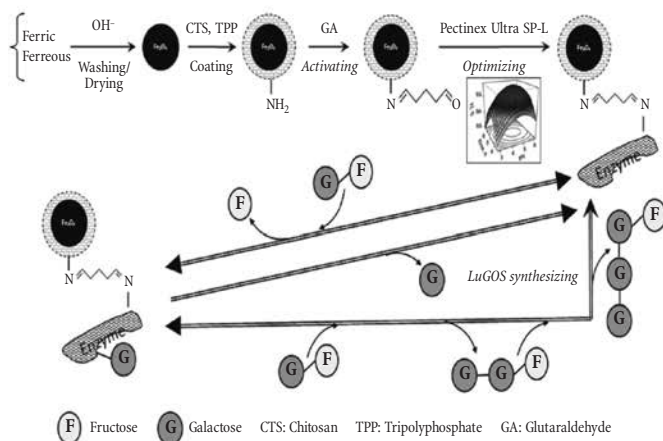


koncentráció, a hőmérséklet és a pH hatását az oligoszacharid-szintézisre. A legnagyobb oligoszacharid-tartalom 30 g/100 ml maltózkoncentráció, 45 °C és pH = 6,0 paraméterek alkalmazásával érhető el. HPLC-módszerrel négyféle, vékonyréteg-kromatográfias módszerrel hatféle különböző polimerizáltsági fokkal rendelkező oligoszacharid termék volt kimutatható.

A szintetizált oligoszacharidok tisztítását FLPC-berendezéssel elvégezve sikeresen elválasztottuk az oligoszacharidokat a szubsztátumtól és a glükóztól. Az így kapott oligoszacharid-keverék különböző probiotikus és potenciális patogén baktériumok által történő hasznosíthatóságát vizsgáltuk. Ennek során kimutattuk, hogy a szintetizált oligoszacharidok között fellelhető olyan szénhidrát (OS4), amelyet a potenciális patogén baktériumok nem, viszont a probiotikus bifidobaktériumok hasznosítani képesek. Ez az eredmény rávilágít arra, hogy e szénhidrát probiotikus tulajdonsággal rendelkezhet. Ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

Rögzített Pectinex ultra SP-L enzimek készítése

Az oligoszacharid-szintézist kereskedelmi forgalomban kapható Pectinex ultra SP-L enzimek készítményt felhasználva is vizsgáltuk (4. ábra). Ezt az enzimek készítményt az élelmiszeripari ártásban szé-



4. ábra. Laktulózalapú oligoszacharidok szintézisének sematikus ábrája [15]

les körben alkalmazzák, főként gyümölcslevek előállításánál a lehozam növelése céljából. A specifikáció alapján a készítmény *Aspergillus aculeatus* eredetű pektin-transzeliminázt, poligalakturonázt és pektinészterázt, valamint kis mennyiségben cellulázt és hemicellulázt is tartalmaz. Del-Val és munkatársai [11] publikáltak először a készítmény β -galaktozidáz-aktivitásáról, amellyel 6'-galaktozil-laktózt szintetizáltak. Később Aslan és Tanriseven [12] kovalens kötéssel rögzítette e β -galaktozidáz enzimet Eupergit C hordozóra. Megállapították, hogy a rögzítés során nem változik az enzim hőmérséklet- és pH-optimuma, viszont nő a stabilitása. Fernandez-Rodríguez és munkatársai [13] a laktulózt alkalmazva szubsztátumként transzgalaktozilációs reakcióval állítottak elő oligoszacharidot az enzimek készítménnyel. Mindezek alapján rögzített Pectinex ultra SP-L enzimek készítmény alkalmazását vizsgáltuk a laktulózalapú oligoszacharid előállításánál [14]. Az enzim rögzítése kovalens kötéssel történt, kitozánnal bevont mágneses nanorészecskén és kitozánnal bevont mágneses nanorészecskék esetén 98,8%, míg a kitozán-mikrorészecskékénél 71% volt.

Meghatároztuk a rögzített enzim pH- és hőmérséklet-optimumát. A kitozánhordozó esetén az optimális hőmérséklet 60 °C,

amely a szabad enzimmel azonos érték, míg a mágneses hordozó esetén szélesebb tartományban, 45 °C – 65 °C között található. A különböző rögzítési technológiák alkalmazása nem befolyásolta jelentősen az optimális pH-értéket, azonban jobb működést és nagyobb hőstabilitást eredményezett a rögzítés. A szabad enzimnél mért felezési idő 2,5 nappal több mint 6 nappal nőtt a mágneses nanorészecskék esetén, míg a kitozán esetén 14 nappal. A kitozánhordozóhoz rögzített Pectinex ultra SP-L alkalmazásával töltött ágyas bioreaktorban folyamatos biokonverziót valósítottunk meg oligoszacharidok előállítására. A 40 cm hosszú, 6 cm külső és 1,9 cm belső átmérőjű oszlopon, 30% kezdeti laktulózkoncentráció alkalmazásával, 27 ml/óra áramlási sebesség mellett érhető el a maximális galakto-oligoszacharid mennyiség (18%). Az így kialakított rendszerben előállított oligoszacharidok DP3 és DP4 oligomerek [15].

E doktori kutatási eredmények elsősorban alapkutatás jellegűek, de hozzájárulhatnak az oligoszacharid-szintézisek katalitikus mechanizmusainak jobb megértéséhez, a biológiai funkciók feltárásához, valamint elősegíthetik kívánt szerkezetű, illetve funkciójú termék előállítását szolgáló enzimes technológiák fejlesztését. Továbbá, a mikrobiális üzemanyagcella alkalmazása csökkentheti a szennyvíztisztítás költségét, valamint távlatban elektromosenergia-forrást vagy bioszenzort biztosít más területek számára – ilyen lehet például a diagnosztika, az orvosi endoszkópos műszerek fejlesztése, a bioremediáció vagy akár az űrkutatás.

IRODALOM

- [1] D. R. Lovley, Bug juice: harvesting electricity with microorganisms, *Nat. Rev. Microbiol.* (2006) 4, 497.
- [2] K. Rabaey, G. Lissens, W. Verstraete, Microbial fuel cells: performances and perspectives. in: *Biofuels for Fuel Cells: Renewable Energy from Biomass Fermentation*. IWA Publishing, 2005, 1.
- [3] A. Szöllösi, J. M. Rezeszy-Szabó, Á. Hoschke, Q. D. Nguyen, Novel method for screening microbes for application in microbial fuel cell, *Biores. Technol.* (2015) 179, 123.
- [4] C.H. Feng, X.J. Yue, F.B. Li, C.H. Wei, Bio-current as an indicator for biogenic Fe(II) generation driven by dissimilatory iron reducing bacteria, *Biosens. Bioelectron.* (2013) 39, 51.
- [5] A. Szöllösi, Á. Hoschke, J. M. Rezeszy-Szabó, E. Bujna, Sz. Kun, Q. D. Nguyen, Formation of novel hydrogel bio-anode by immobilization of biocatalyst in alginate/polyaniline/titanium-dioxide/graphite composites and its electrical performance, *Chemosphere* (2017) 174, 58
- [6] R.G. Crittenden, M.J. Playne, Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides, *Trends Food Sci. Technol.* (1996) 7, 353.
- [7] V. Maitin, R.A. Rastall, K. Shetty, G. Paliyath, A. L. Pometto, R. E. Levin, Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides: Progress and Recent Trends. In: *Functional Foods and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2007.
- [8] B. A. Rabiou, A. J. Jay, G. R. Gibson, R. A. Rastall, Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by β -galactosidases from *Bifidobacterium* species, *Appl. Environm. Microbiol.* (2001) 67, 2526.
- [9] G. Tzortzis, A. K. Goulas, G. R. Gibson, Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2005) 68, 412.
- [10] K. Pokusaeva, G. E. Fitzgerald, D. van Sinderen, Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*, *Genes Nutr.* (2011) 6, 285.
- [11] M. I. Del-Val, C. G. Hill Jr, J. Jimenez-Barbero, C. Otero, Selective enzymatic synthesis of 6-galactosyl lactose by Pectinex ultra SP in water, *Biotechn. Letters*, (2001) 23, 1921.
- [12] Y. Aslan, A. Tanriseven, Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* (2007) 45, 73.
- [13] M. Fernandez-Rodríguez, A. Cardelle-Cobas, M. Villamiel, J. R. Banga, Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β -galactosidases, *J. Biotechnol.* (2011) 153, 116.
- [14] G. Styevková, Cs. Styevková, Á. Hoschke, Q.D. Nguyen, Oligosaccharide synthesized by glycosyltransferase activity from Pectinex ultra SP-L enzyme preparation, *Acta Alim.* (2013) 42, 99.
- [15] V. D. Nguyen, G. Styevková, L. P. Ta, A. T.M. Tran, E. Bujna, P. Orbán, M. S. Dam, Q. D. Nguyen, Immobilization and some properties of commercial enzyme preparation for production of lactulose-based oligosaccharides, *Food Bioprod. Process.* (2018) 107, 97.