



Charakterystyka i zastosowanie kwasu laktobionowego Część 2

Kamila Goderska

Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
kamila.goderska@up.poznan.pl

Otrzymywanie kwasu laktobionowego

Kwas laktobionowy otrzymywany jest poprzez chemiczne, elektrochemiczne, katalityczne oraz enzymatyczne utlenianie laktozy.

Laktoza jako substrat

Laktoza (β -D-galaktopiranozylo-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukoza) jest produkowana na skalę przemysłową od ponad 100 lat. Tłuszcze, białka, laktoza oraz substancje mineralne mleka są obecne w serwatce, która jest uwalniana podczas produkcji sera. Ze względu na to, że serwatka zawiera ok. 4-5% laktozy, jest ona jedną z najbardziej preferowanych substancji do otrzymywania czystej laktozy. Laktozę otrzymuje się poprzez zagęszczenie cieczy powstałej po oddzieleniu tłuszczu, białek i substancji mineralnych z serwatki, a otrzymany koncentrat poddaje się krystalizacji. Następnie kryształki są myte, suszone i pakowane. Dzięki postępowi technologii membranowej i spadkowi kosztów membran, systemy filtracji stały się najbardziej znaczącymi metodami produkcji laktozy. W tej metodzie, bezbiałkowa laktoza jest produkowana poprzez skuteczne zapewnienie odzysku białek serwatkowych [3].



Enzymy biorące udział w utlenianiu laktozy posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Oksydaza laktozowa utlenia laktozę do kwasu laktobionowego i redukuje tlen, wytwarzając H_2O_2 . Wyniki badań potwierdzają, że ten enzym wykazuje działanie hamujące przeciwko wzrostowi patogenów przenoszonych przez żywność i mikroorganizmów powodujących psucie się żywności związanej z produktami mlecznymi takimi jak: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser. *typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi*, oraz *Penicillium chrysogenum*. Zastosowanie enzymów jako środków przeciwdrobnoustrojowych w produktach mlecznych jest potencjalnym sposobem kontroli wzrostu mikroorganizmów bez etapu obróbki termicznej. Badania wykazały, że oksydaza laktozy może być wykorzystana jako nowe podejście do hamowania wzrostu pleśni i bakterii oraz jako przyjazny dla etykiety konserwant produktów mleczarskich [12, 24].

Również produkty utleniania laktozy wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe. Udowodniono potencjał antybiofilmowy kwasu laktobionowego przeciwko *Salmonella enterica* ser. *typhimurium*. LBA hamował tworzenie się biofilmu *S. typhimurium* na powierzchni stali nierdzewnej oraz szkła. Oprócz tego, kwas laktobionowy ograniczył ruchliwość bakterii, zahamował produkcję pozakomórkowego polisacharydu i białka podczas tworzenia się biofilmu. Analiza ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym ujawniła, że LBA obniżył ekspresję genów zaangażowanych w tworzenie biofilmu *S. typhimurium* [11].

Laktoza odznacza się szerokim zastosowaniem w przemyśle farmaceutycznym, paszowym i spożywczym. Zastosowanie znalazła jako dodatek do żywności dla niemowląt oraz jako dodatek do leków, głównie jako nośnik w produktach farmaceutycznych. Na drodze hydrolizy może być również stosowana przy produkcji glukozy, galaktozy oraz pochodnych laktozy. Często staje się składnikiem diet, ze względu na wartość kaloryczną, niski indeks glikemiczny oraz moc słodzenia. Laktoza przyjmowana z mlekiem i produktami mlecznymi fermentuje w jelicie tworząc kwas mlekowy. Powstałe w ten sposób kwaśne środowisko reguluje wchłanianie wapnia i potasu w jelicie [3].

Laktaza hydrolizuje laktozę na glukozę i galaktozę. Enzym ten jest syntetyzowany w jelicie cienkim przez mikrokosmki. Zależnie od predyspozycji genetycznych i struktury populacji, synteza tego enzymu może ulec zmniejszeniu z wiekiem, prowadzi to do trudności podczas trawienia mleka i produktów zawierających laktozę. To zaburzenie określane jest jako „nietolerancja laktozy” a objawami są biegunka oraz bóle brzucha. Kiedy laktoza dostanie się do jelit, jej koncentracja wzrasta z powodu braku laktazy. To skłania wodę do przemieszczenia się z krwi do przewodu pokarmowego w celu przywrócenia równowagi osmotycznej. Powoduje to nieprawidłową fermentację, skutkującą wzdęciem oraz bólem brzucha. Najpopularniejszymi zabiegami mającymi na celu uzyskanie mleka bez laktozy są ultrafiltracja, obróbka cieplna oraz hydroliza przez dodatek odpowiednich enzymów [7].



Chemiczne utlenianie laktozy

Początkowo otrzymywanie LBA polegało na utlenianiu laktozy ciekłym bromem lub jego solami [36], przy czym produktem reakcji był techniczny kwas laktobionowy, który następnie należało oczyścić i osuszyć. Znałe jest również działanie kwasami mineralnymi na sól wapniową lub ołowiową kwasu laktobionowego.

Jednak, tak jak w pierwszym przypadku, proces ten wymaga skomplikowanej aparatury, co w negatywny sposób wpływa na wydajność i jakość produktu. Najbardziej efektywnym chemicznym sposobem utleniania laktozy do kwasu laktobionowego jest wykorzystanie soli bromolaktobionianu wapnia i poddanie jej stopniowemu rozkładowi do wolnego kwasu laktobionowego. Według patentu P 104901 [35], na podwójną sól bromolaktobionianu wapnia działa się zawieszoną tlenku wapnia w wodzie, w wyniku czego otrzymuje się zasadowy laktobionian wapnia, który po odsączeniu i przemyciu wodą wapienną poddaje się działaniu gazowego CO_2 do pH ok. 7. Następnie obojętny laktobionian wapnia odsącza się od wytrąconego CaCO_3 i na kolumnie jonitowej przekształca w wolny kwas laktobionowy.

Elektrochemiczne utlenianie laktozy

Otrzymywanie LBA na drodze elektrochemicznego utleniania przeprowadzano przy użyciu bromku wapnia i wodorotlenku sodu. Wg Sołowiewicza i Jankiewicz-Niewiadomej (1992) [34] utlenianiu elektrochemicznemu poddaje się roztwór wodny laktozy oraz bromku sodu, który przepuszcza się przez elektrolizer z przepuszczalną anodą, gdzie pod wpływem energii elektrycznej dochodzi do utlenienia laktozy. Elektrochemiczne utlenianie laktozy do kwasu laktobionowego przeprowadzano również na zmodyfikowanych elektrodach ołowianych w buforowym roztworze Na_2CO_3 . Wykazano, że po 4 godzinach 95% laktozy zostało utlenione, przy 75% selektywności elektrod Pt i Pb w kierunku kwasu laktobionowego. Niestety, ze względu na wytwarzanie produktów toksycznych i dużą absorpcję przez elektrody tych produktów, metoda ta stała się mało opłacalna. Pełną selektywność otrzymuje się wykorzystując elektrody ze złota. Jednak i w tym przypadku z czasem również zaobserwowano powstawanie niekorzystnych produktów ubocznych i zanieczyszczenie elektrod. Produkcja LBA na drodze elektrochemicznego utleniania, choć w skali laboratoryjnej charakteryzuje się dużą wydajnością, to niestety, jej realizacja na skalę przemysłową jest obecnie niemożliwa ze względu na zbyt wysokie koszty i problemy związane z wytwarzaniem związków toksycznych [10].

Katalityczne utlenienie laktozy

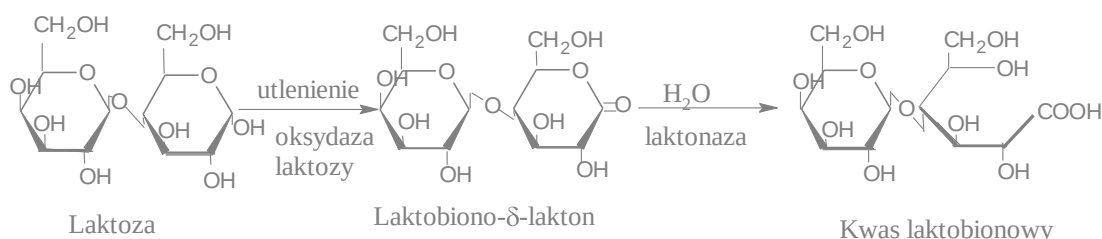
Kwas laktobionowy można otrzymywać z laktozy poprzez selektywne, katalityczne utlenienie grupy aldehydowej przy atomie węgla C1 tego dwucukru do grupy karboksylowej. Grupy alkoholowe przy innych atomach węgla nie ulegają w tym procesie utlenieniu. Produktem tej reakcji jest kwas laktobionowy [19].



Heterogenicznymi katalizatorami wykorzystywanymi w tej reakcji są przede wszystkim metale szlachetne takie jak platyna, pallad oraz złoto. Reakcja katalitycznego utleniania przebiega najczęściej w reaktorze trójfazowym, gdzie sproszkowany katalizator zawieszony jest w fazie ciekłej zawierającej utleniany związek i podczas reakcji przepuszcza się tlen. Obecnie najdokładniej zbadane są katalizatory palladowe i platynowe. Jednak wykorzystane do utleniania laktozy, wykazują niską selektywność i niski stopień przereagowania, jak również dochodzi do szybkiej dezaktywacji katalizatora prawdopodobnie na skutek zbyt dużej adsorpcji tlenu. Wpływ niektórych z tych czynników można skutecznie zwiększać poprzez dodatek bizmutu lub ołowiu, które wg Karskiego (2006) [16] znacznie polepszają stopień konwersji laktozy i mogą powodować całkowite ich przereagowanie. W badaniach prowadzonych w ostatnich latach do utleniania laktozy został wykorzystany katalizator ze złota, wcześniej wykorzystywany do utleniania propenu [21, 25]. W porównaniu z katalizatorami palladowymi i platynowymi, katalizator ze złota wykazuje dużo większą odporność na dezaktywację i nie wymaga kontroli pH.

Mikrobiologiczne utlenianie laktozy

W mikrobiologicznym utlenianiu laktozy do LBA wykorzystuje się zarówno zewnątrzkomórkowe, jak i wewnątrzkomórkowe enzymy różnych drobnoustrojów, m.in.: *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas taetrolens*, *Acetobacter orientalis*, *Microdochium nivale*, *Zymomonas mobilis* (rys. 2) [4, 6, 18, 20, 21, 23, 27, 32]. Zgodnie z danymi literaturowymi proces utleniania laktozy do LBA jest dwuetapowy [1]. W pierwszym utlenianiu laktozy do laktobiono- δ -laktonu katalizuje laktozo-oksydaza, a biokatalizatorem w drugim etapie jest laktonaza, dzięki której laktobiono- δ -lakton zostaje przekształcony w kwas laktobionowy.



Rysunek 2. Schemat otrzymywania kwasu laktobionowego z laktozy z użyciem drobnoustrojów [14]

Chociaż mikrobiologiczne metody otrzymywania kwasu laktobionowego są czasochłonne i kosztowne, to jednak ze względu na dużą wydajność są obecnie najczęściej stosowane do otrzymywania kwasu laktobionowego. Drzemie w nich jeszcze duży potencjał, a jedną z obiecujących możliwości jego lepszego wykorzystania jest stosowanie bakterii z gatunku *Pseudomonas taetrolens* [13].



Charakterystyka serwatki w produkcji kwasu laktobionowego

Serwatka jest jednym z najczęściej występujących produktów ubocznych przemysłu mleczarskiego. Szacuje się, że ok. 50% powstającej serwatki jest bezpośrednio odprowadzane do systemów wodnych, powodując straty ekonomiczne i problemy związane z zanieczyszczeniem środowiska (dane z 2020 roku). W związku z tym, przemysł spożywczy stara się znaleźć konkretne zastosowania dla serwatki, w celu zmniejszenia problemów środowiskowych. Serwatka może być poddawana różnym procesom takim jak: deproteinizacja, mikrofiltracja i ultrafiltracja w celu wytworzenia skoncentrowanych białek serwatkowych.

Uzyskany w tych procesach permeat serwatki składa się głównie z laktozy (5%), wody (93%) i składników mineralnych (0,53%), z minimalną ilością białek (0,85%) i tłuszczów (0,36%). Tak ubogi skład ogranicza jego zastosowanie a jednym ze sposobów wykorzystania tego produktu ubocznego jest produkcja na drodze fermentacji mikrobiologicznej różnych związków, takich jak: oligosacharydy, kwas mlekowy oraz kwas laktobionowy (LBA) [28].

W ostatnich latach produkcja serwatki kwasowej znacznie wzrosła ze względu na zwiększoną ilość wyprodukowanych serów twarogowych i jogurtów greckich. Wysokie biologiczne zapotrzebowanie na tlen dla serwatki kwasowej stwarza problem w zagospodarowaniu tego produktu ubocznego. Zastosowanie serwatki kwasowej ogranicza również jej niskie pH, krótki okres przydatności do spożycia, a także lekko słony smak. Skład kwaśnej serwatki utrudnia konwersję laktozy do kwasu laktobionowego przez *Pseudomonas taetrolens*. Porównując właściwości słodkiej i kwaśnej serwatki prowadzone są badania w celu zwiększenia przydatności serwatki kwasowej do produkcji LBA. Istotna jest ilość soli, stężenie białka, pH, objętość inokulum oraz czas hodowli. Wyniki badań wykazały, że wyższe stężenie białka i kwasu mlekowego w podłożu negatywnie wpływa na utlenianie laktozy do LBA, zwiększenie ilości serwatki kwasowej w podłożu może wpłynąć na wydajność LBA, a kombinacja słodkiej i kwaśnej serwatki może być dobrym rozwiązaniem dla biotechnologicznej produkcji LBA z wykorzystaniem odpadów mleczarskich. Istotne jest również to, że wielokrotne dodawanie inokulum *P. taetrolens* do substratu z serwatki kwasowej optymalizuje konwersję laktozy do LBA [25, 30].

Poddano badaniom przydatność kwaśnej serwatki do produkcji kwasu laktobionowego przy użyciu hodowli w kolbie wstrząsanej i bioreaktorze oraz porównano wyniki z serwatką słodką. Wykazano, że najbardziej odpowiednią metodą do produkcji kwasu laktobionowego przy użyciu *Pseudomonas taetrolens* jest bioreaktor z wykorzystaniem słodkiej serwatki jako substratu w kontrolowanych warunkach pH. Natomiast użycie kwaśnej serwatki jako substratu do konwersji laktozy jest lepsze w bioreaktorze, a utrzymanie fermentacyjnego pH medium na poziomie 6,5 determinuje najlepsze warunki fermentacji [29].



Charakterystyka bakterii *Pseudomonas taetrolens*

Bakterie z gatunku *P. taetrolens* należą do rodzaju *Pseudomonas* i zaliczają się do gammaproteobakterii. Drobnoustroje należące do tego rodzaju są mikroorganizmami tlenowymi i nie tworzą zarodników. Mają kształt pałeczek i wyposażone są w polarne wici, które umożliwiają im poruszanie [9]. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* są zdolne do metabolizowania szerokiego zakresu toksycznych związków nieorganicznych i organicznych, takich jak węglowodory alifatyczne i aromatyczne. Odgrywają istotną rolę w obiegu węgla w przyrodzie [16].

Istnieją szczepy *Pseudomonas* odporne na działanie antybiotyków, środków dezynfekujących, detergentów czy rozpuszczalników organicznych. Są to wszechobecne drobnoustroje, zdolne do życia w różnorodnych warunkach środowiska. Zasadniają zróżnicowane środowiska: glebę, wodę, tkanki roślinne i zwierzęce. Niektóre gatunki są patogenami roślin, zwierząt i ludzi [26]. Mikroorganizmy te są zdolne do życia w przedziale temperatur od 4 do 42°C, w pH od 4 do 8, konieczne są warunki tlenowe, a także dostęp do prostych lub złożonych składników organicznych [21].

Systematyka bakterii z gatunku *Pseudomonas taetrolens* przedstawia się następująco (Global Catalogue of Microorganisms): Królestwo: bakterie; Typ: proteobakterie; Klasa: gammaproteobakterie; Rząd: *Pseudomonadales*; Rodzina: *Pseudomonadaceae*; Rodzaj: *Pseudomonas*; Gatunek: *Pseudomonas taetrolens*

Bakterie z gatunku *P. taetrolens* są gram-ujemnymi pałeczkami zdolnymi do ruchu i niewytwarzającymi zarodników. Alonso i in. (2011) [1] podają, iż w pH 6,5 i warunkach tlenowych, następuje silny wzrost tych drobnoustrojów, zachowana jest także ich aktywność metaboliczna i integralność membran komórkowych. W środowisku kwasowym (pH=3,35) ich błony komórkowe mogą ulegać depolaryzacji prowadzącej do tworzenia agregatów lub śmierci mikroorganizmów. Środowisko zasadowe (pH>7) nie stymuluje produkcji kwasu laktobionowego ani wzrostu komórek *P. taetrolens* [2]. Według Leibniz Institute DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH) optymalna temperatura do rozwoju tych mikroorganizmów wynosi 28°C. Bakterie te są niekorzystne w przemyśle żywnościowym. Przyczyniają się do psucia produktów mięsnych i rybnych, nawet tych przechowywanych w warunkach chłodniczych. Odpowiadają za nieprzyjemny, zgniły i siarkowy zapach jaj oraz mięsa [7].

Interesującym źródłem laktozy, substratu w mikrobiologicznej produkcji kwasu laktobionowego, może być serwatka. Obecnie służy ona głównie do produkcji szerokiej gamy białek. Warto jednak zwrócić uwagę, że ten sposób jej zagospodarowania nie pozwala na wykorzystanie obecnej w niej laktozy. Możliwość biokonwersji tego węglowodanu do kwasu laktobionowego wydaje się być interesującym przedmiotem badań naukowych. Tym bardziej, że może on się przyczynić do lepszego wykorzystania serwatki, która stanowi obecnie uciążliwy produkt uboczny w procesie otrzymywania sera (ok. 96% objętościowych w odniesieniu do zużytego mleka) lub kazeiny (ok. 6% objętościowych zużytego mleka).



Ze 100 dm³ przerabianego mleka podczas produkcji sera uzyskuje się jej ok. 80-90 dm³. Światowa produkcja serwatki wynosi ponad 160 milionów ton rocznie, a jej wzrost prognozuje się na 1-2% rocznie [4]. Dlatego też opracowanie nowych metod wykorzystania serwatki jest ciągle ważne zarówno z punktu widzenia ekologicznego, jaki i biotechnologicznego.

Literatura

1. Alonso S., Rendueles M., Díaz M. (2011). Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. *Bioresource Technology*, 102, 9730–9736.
2. Alonso S., Rendueles M., Díaz M. (2013). Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. *Biotechnology Advances*, 31, 1275–1291.
3. Andic S., Oğuz S. (2022). Lactose and Lactose Derivatives. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 10(6), 1130-1137.
4. Borges da Silva E.A., Pedruzzi I., Rodrigues A.E. (2010). Simulated moving bed technology to improve the yield of the biotechnological production of lactobionic acid and sorbitol. *Adsorption*, 17, 145–158.
5. Božanić R., Barukčić I., Lisak K., Jakopović Tratnik L. (2014). Possibilities of whey utilization. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2, 7, 1-7.
6. Budtz P., Vindelov J.T., Nordkvist M. (2007). Enzymatic process for obtaining increased yield of lactobionic acid. Patent: US 2007/0105200 A1
7. Costa A., Lopez-Villalobos N., Sneddon N.W. Shalloo L., Franzoi M., De Marchi M., Penasa M. (2019). Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 5883-5898.
8. Davies A.R., Board R.J., Board R.G. (1998). *Microbiology of meat and poultry*, Springer Science & Business Media 5–175.
9. De Vos P., Van Landschoot A., Segers P., Tytgat R., Gillis M., Bauwens M., Rossau R., Goor M., Pot B., Kersters K., Lizzaraga P., De Ley J. (1989). Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxyribonucleic acid: Ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 1, 35-49.
10. Dhariwal A., Mavrov V., Schroeder I. (2008). Production of lactobionic acid with process integrated electrochemical enzyme regeneration and optimisation of process variables using response surface methods (RSM). *Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic*, 42, 64–69.
11. Fan Q., He Q., Zhang T., Song W., Sheng Q., Yuan Y., Yue T. (2022). Antibiofilm potential of lactobionic acid against *Salmonella typhimurium*. *LWT – Food Science and Technology*, 162(113461), 1-8.



12. Flynn B.T., Kozak S.M., Lawton M.R., Alcaine S.D. (2021). Lactose oxidase: An enzymatic approach to inhibit *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Dairy Science*, 104(10), 10594-10608.
13. Goderska K., Szwengiel A., Czarnecki Z. (2014). The utilization of *Pseudomonas taetrolens* to produce lactobionic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 2189 – 2197.
14. Gutiérrez L., Hamoudi S., Belkacemi K.. (2012). Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. *International Dairy Journal*, 26, 103 – 111.
15. Hallamaa K., Mattila-Sandholm T., Moatto J., Saarela M. (2003). The effect of lactose derivatives lactulose, lactiol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. . *International Dairy Journal*, 13, 291–302.
16. Karski S. (2006). Katalityczne utlenianie laktozy na układach Pd-Bi/SiO₂. *Przemysł Chemiczny*, 85, 3, 201-204.
17. Kersters K., Ludwig W., Vancanneyt M., De Vos P., Gillis M., Schleifer K.H. (1996). Recent changes in the classification of the *Pseudomonas*: an Overview. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 465–477.
18. Kiryu T., Yamauchi K., Masuyama I., Ooe K., Kimura T., Kiso T., Nakano H., Murakami H. (2009). Optimization of lactobionic acid production by *Acetobacter orientalis* isolated from Caucasian fermented milk, "Caspian Sea Yogurt". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 76, 2, 361-363.
19. Kowalczyk J., Berndt H., Pitsch I. (2006). Method for the selective oxidation of carbohydrates with use of catalysts with gold deposited on a support. PL/EP 1631537
20. Maischberger T., Nguyen T.H., Sukyai P., Kittl R., Riva S., Ludwig R., Haltrich D. (2007). Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. *Applied Catalysis A- General*, 402, 94– 103.
21. Miyamoto Y., Ooi T., Kinoshita S. (2000). Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas* sp. LS13-1. *Biotechnology Letters*, 22, 427–430.
22. Moore E.R.B., Tindall B.J., Martins Dos Santos V.A.P., Pieper D.H., Ramos J.-L., Palleroni N.J. (2006). The Prokaryotes, Volume 6: Proteobacteria: Gamma subclass, nonmedical: *Pseudomonas*. Springer, New York: 646 – 703.
23. Murakami H., Seko A., Azumi M., Ueshima N., Yoshizumi H., Nakanol H., Kitahata S. (2002). Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Glycoscience*, 50, 117-120
24. Lara-Aguilar S., Alcaine S.D. (2019). Short communication: Screening inhibition of dairy-relevant pathogens and spoilage microorganisms by lactose oxidase. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 7807-7812.



25. Nakano H., Kiryu T., Kiso T., Murakami H. (2006). Lactobionic acid and its biocatalytic production. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 211, 874-881.
26. Narala V.R., Zagorska J., Sarenkova I., Ciprovica I., Majore K. (2022). Acid Whey Valorization for Biotechnological Lactobionic Acid Bio-production. *Journal of Human, Earth, and Future*, 3, 46-55.
27. Nishizuka Y., Hayaishi O. (1962). Formation of lactobionic acid from lactose. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 2721-1208.
28. Palleroni N.J. (1993). *Pseudomonas* classification, A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 231–251.
29. Sáez-Orviz S., Marcet I., Rendueles M., Díaz M. (2022). Preparation of Edible Films with *Lactobacillus plantarum* and Lactobionic Acid Produced by Sweet Whey Fermentation. *Membranes* 2022, 12(115),1-14.
30. Sarenkova I., Saez-Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. (2021). Lactobionic Acid Production from Acid Whey under Different Fermentative Conditions. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 8(2), 35-40.
31. Sarenkova I., Saez-Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. (2022). Lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens* in a fed-batch bioreactor using acid whey as substrate. *International Journal of Dairy Technology*, 75(2), 361-371.
32. Satory M., Furlinger M., Haltrich D., Kulbe K.D., Pittner F., Nidetzky B. (1997). Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Applied Catalysis A- General*, 402, 94– 103.
33. Silva E.M., Yang S.T. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science*, 78, 2542–2562.
34. Sołowiewicz R., Jankiewicz-Niewiadoma B. (1992). A method for producing sodium lactobionian. *Int. Cl.4 C07C 59/17*
35. Urbański T., Kolesińska J., Żywił J., Cieślak J. (1966). Opis patentowy: Sposoby otrzymywania czystego kwasu laktobionowego. P 104 901 Opublikowano 26.04.1966
36. Yang B.Y., Montgomery R. (2005). Oxidation of lactose with bromine. *Carbohydrate Research*, 340, 2698–2705.