3(1): 36-41 (2017) doi: 10.3153/JFHS17005

Journal of Food and Health Science

E-ISSN 2149-0473

REVIEW ARTICLE DERLEME MAKALESİ

LAKTULOZ ELDESİ VE TESPİT EDİLMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Hatice Şanlıdere Aloğlu, Harun Uran

Kırklareli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kırklareli, Türkiye

Received: 28.10.2016

Accepted: 23.12.2016

Published online: 29.12.2016

Corresponding author:

Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU, Kırklareli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayalı Yerleşkesi, Kırklareli, Türkiye

E-mail: haticealoglu@klu.edu.tr

Öz:

Laktuloz, laktozun izomerizasyonu sonucu oluşan bir disakkarit olup, çok değerli bir fonksiyonel maddedir. Teknolojik olarak öneminin yanı sıra laktulozun birçok fonksiyonel özelliği de bulunmaktadır. İnce bağırsak mukozasında herhangi bir değişikliğe uğramadan kalın bağırsağa geçerek öncelikle bifidobakterler gibi metabolizma için yararlı olan probiyotik bakteriler tarafından kullanılmakta ve bu bakterilerin gelişimini teşvik etmektedir. Ayrıca patojen bakterilere karşı probiyotik bakterilerin etkisinin laktuloz katkısı ile ciddi düzeyde desteklendiği pek çok araştırmada bildirilmektedir. Bu çalışmada laktulozun tespiti ve eldesinde kullanılan yöntemler ile çeşitli süt ürünlerinde laktuloz miktarlarına ilişkin bilgilere yer verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktuloz, Süt ürünleri, Laktuloz tespiti, Laktuloz eldesi

Abstract:

PRODUCTION OF LACTULOSE AND METHODS USED TO DETERMINATION

Lactulose is a disaccharide, which is occurred as a result of isomerization of lactose and a very valuable functional subtance. There are also several functional properties of lactulose as well as technological importance. It goes through the colon without any changes in the intestinal mucosa and used by probiotic bacteria such as bifidobacteria which are useful for metabolism. Also it encourages of these bacteria. In addition, it has been reported in many studies that lactulose has significant support effect on probiotics against pathogen bacteria. In this study, some informations are given about obtaining and determining methods of lactulose and also the amount of lactulose in various dairy products.

Keywords: Lactulose, Dairy products, Determination, Obtain of lactulose

© 2015-2017 ScientificWebJournals (SWJ)

Giriş

Laktuloz (4-O-b-D-galaktopiranosil-D-fruktofuranoz); bir disakkarit türevi olup, galaktozun fruktoza β (1-4) glikozidik bağ ile bağlanması sonucu oluşur. İlk kez 1930 yılında Montgomery ve Hudson tarafından elde edilmiştir, doğada doğal olarak bulunmamaktadır. (Özden, 2005; Montilla vd., 2005a; Boitz ve Mayer, 2015). Ampirik formülü, molekül ağırlığı ve erime noktası sırası ile $C_{12}H_{22}O_{11}$, 342.30 g/mol ve 169°C' dir (Nooshkam ve Madadlou, 2016a). Laktulozun enerji değeri düşüktür (2.0 kkal/g), suda çözünürlüğü iyidir, tekstür ve stabilizasyon üzerine etkisi bulunmaktadır.

Laktuloz, ince bağırsak mukozasında herhangi bir değişikliğe uğramadan kalın bağırsağa geçerek öncelikle bifidobakterler gibi metabolizma için yararlı olan probiyotik bakteriler tarafından kullanılmakta ve bu bakterilerin gelişimini teşvik etmektedir. Patojen bakterilere karşı probiyotik bakterilerin etkisinin laktuloz katkısı ile ciddi düzeyde desteklendiği bildirilmektedir. Bu nedenle fonksiyonel değeri yüksek bir prebiyotiktir (Akalın, 2002; Kavas ve Kavas, 2011).

Laktuloz, sakkarozun % 60-80'i oranında tatlılığa sahip olması nedeni ile gıda sanayinde kullanım alanı bulunmaktadır (Nooshkam ve Madadlou, 2016b). Fonksiyonel özellikleri dışında teknolojik olarakta önemlidir ve yoğun olarak kullanılan bir bileşendir. Yapılan bir çalışmada laktuloz ilaveli bebek mamaları ile beslenen bebeklerin bağırsak florasının anne sütü ile beslenen bebeklerin florasına yakın olduğu belirtilmektedir. Laktuloz, özellikle fonksiyonel özellik kazandırmak amacı ile bebeklerin beslenmesinde Japonya ve Avrupa'da tercih edilmektedir (Özden, 2005). Laktozdan biraz daha tatlı olması nedeni ile diyabetik ürünlerde, laktasif etkili şurupların yapımında ve tıpta "hepatik ensefalopati" olarak adlandırılan rahatsızlığın ve kabızlığın tedavisinde kullanılmaktadır (Nahla ve Musa, 2015**)**. Bağırsaktan toksik maddelerin atımını kolaylaştırdığı gibi bağırsak içeriğini asitleştirerek amonyağın emilimini azaltmakta ve bağırsaktan atılmasını kolaylaştırmaktadır (Akın ve Erden 2002). Laktuloz hem gıda hem de ilaç sanayisinde kullanılan bir maddedir.

Laktuloz Miktarının Tespit Edilmesi

Laktulozun beslenme için önemli bir bileşen olması nedeni ile gıdalardaki miktarının tespit edilmesine yönelik analitik metodlar geliştirilmiştir. Yapılan araştırmalarda laktulozun miktarının belirlenmesinde genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Silveira vd., 2015), gaz kromatografisi (Padilla vd., 2015), ince tabaka kromatografisi (Flick vd., 1987) ve benzer teknolojiler kullanılmaktadır. Ayrıca seliwanoff reaktifi kullanılarak sonuç veren spektrofotometrik yöntemler de mevcuttur (Amine vd., 2000).

Süt, tüketici sağlığı ve raf ömrü açısından farklı süre ve sıcaklıklarda ısıl işleme tabi tutulmaktadır. Uygulanan ısıl işleme bağlı olarak süt bileşenlerinde bazı değişiklikler oluşmakta veya yeni bileşenler ortaya çıkmaktadır. Bu yeni bileşenlerden bir tanesi laktozun ısıl işlem neticesinde izomerizasyonu sonucu sütte oluşan laktulozdur. Oluşan laktuloz miktarı uygulanan ısı yoğunluğu ile doğru orantılıdır ve bu durum nedeni ile süt işleme teknolojisinde kalite kontrol aşamasında kullanılabilecek bir indikatördür (Silveira vd., 2015).

Pastörize, sterilize ve UHT sütlerde laktuloz miktarları yapılan farklı çalışmalarda belirlenmiştir. Pappas vd. (2015) laktulozun pastörize sütte bulunmadığını, direk ve indirek ısıtma tekniğine bağlı olarak UHT sütlerde sırası ile 50-850 ve 190-830 mg/L, sterilize sütlerde ise 1080-1400 mg/L oranında bulunduğu bildirmektedir. Marconi vd. (2004) ise klasik sterilize sütte 744.0 mg/L, indirekt yöntem UHT sütte 341.0 mg/L, direkt yöntem UHT sütte 165.0 mg/L, yüksek sıcaklık uygulanan pastörize sütte 58.0 mg/L, düşük sıcaklık uygulanan pastörize sütte 3.50 mg/L, kaynatılmış sütte 107.0 mg/L laktuloz saptamışlardır. Farklı bir çalışmada UHT sütlerde depolama süresince laktuloz miktarının arttığını belirlenmiştir (Elliott vd., 2005).

İçme sütü teknolojisinin yanı sıra sütten üretilen ürünlerde laktuloz miktarlarına ilişkin araştırmalar bulunmaktadır. Pastörize süt ve süte eşdeğer oranda sulandırılarak hazırlanan süt tozlarının laktuloz oranlarının saptandığı araştırmada pastörize sütte 7.0-28.3 mg/L, süt tozunda 16.1-26.5 mg/L düzeyinde laktuloz tespit edilmiştir (Rafael vd., 1996). Süt ve süt tozu örneklerinde ısıl işlemin düzeyine göre laktuloz miktarı değişim göstermektedir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde yapılan laktuloz tayininde 100°C sıcaklığa kadar yapılan ısıl işlemlerde laktuloz tespit edilmediği, 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda laktuloz oluşumunun görüldüğü ve 130°C'den sonra maksimum seviyelere (130°C'de 551 mg/L, 140°C'de

1549 mg/L) çıktığı belirtilmektedir (Sakkas vd., 2014).

Yeni doğan bebeklerin beslenmesinde kullanılan mamaların bileşiminde süttozu ve peyniraltı suyu tozu vb. kullanılmaktadır. Gonzáles vd. (2003) süt ve peyniraltı suyu ile zenginleştirilmiş yeni doğan formülasyonlarında enzimatik olarak laktuloz miktarını belirlemişlerdir. Peyniraltı suyu ile zenginleştirilmiş formülasyonlarda laktuloz miktarının yüksek olduğu (97-312 mg/L) gözlemlenirken, zenginleştirme yapılmayan sütlerde ise düşük olduğu (29-108 mg/L) belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada pastörize, uzun raf ömürlü ve UHT krema örneklerinde laktuloz miktarları sırası ile 29 ±10, 56 ±41 ve 201 ±24 mg /L olarak bulunmuş olup laktulozun bu ürünlerde ısı yükünü değerlendirmede güvenilir olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Boitz ve Mayer, 2015). Ayrıca ısıl işlem görmüş ve dondurularak kurutulmuş süt örneklerinde laktuloz miktarını herhangi bir kimyasal ön hazırlık gerektirmeyen dağınık yansıtıcılı kızılötesi Fourier dönüşümlü spektroskopi (DRIFTS) ile belirlemek için basit, zararsız, ucuz ve kısa sürede sonuç veren bir yöntem geliştirilmiştir (Pappas vd., 2015).

Görüldüğü üzere süt ve süt esaslı ürünlerde işleme yöntemlerine göre laktuloz oluşmakta ve miktarı uygulanan prosese göre değişmektedir. Son yıllarda laktuloz oluşumu ve miktarının farklı metotlarla tespit edilmesine yönelik yapılan araştırmaların arttığı da gözlenmektedir.

Farklı Yöntemlerle Laktuloz Eldesi

Laktulozun oluşumu için farklı yöntemler bulunmaktadır. Laktuloz, temel olarak kimyasal izomerizasyon (asit veya baz kullanarak) ya da enzimatik sentez yöntemleri ile elde edilebilmektedir (Sitanggang vd., 2015). Endüstriyel olarak laktuloz üretimi Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein (LA) olarak belirtilen özel bir reaksiyonla gerçekleştirilmektedir. Bu reaksiyon, uygun pH, basınç ve sıcaklıkta alkali ortamda ilerlemektedir. Katalizör olarak sodyum, potasyum ve kalsiyum hidroksitler, tersiyer aminler, magnezyum oksit, sodyum ve potasyum karbonatlar kullanılmaktadır (Nooshkam ve Madadlou, 2016a). Bu katalizörlerin yanı sıra amonyum karbonat kullanımının alternatif çevre dostu bir kimyasal olacağı bildirilmektedir (Seo vd., 2016). Alternatif katalizör madde bulmak üzere yapılan araştırmaların son yıllarda artış gösterdiği görülmektedir. Kullanılacak olan katalizörün düşük maliyetli, ortamdan kolay uzaklaştırılabilir, çevre dostu, güvenli ve toksik olmaması gerekmektedir (Panesar ve Kumari, 2011).

Nooshkam ve Madadlou (2016a) bileşiminde yaklaşık % 96 kalsiyum karbonat, % 1 magnezyum karbonat, % 1 kalsiyum fosfat, organik madde ve su içermesi nedeni ile yumurta kabuğunun, laktozdan laktulozun izomerizasyonunu sağlamak amacı ile kalsiyum karbonat bazlı katalizör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yumurta kabuğunun katalizör olarak kullanıldığı araştırmada laktozun laktuloza dönüşüm verimi % 17.3 olarak bulunmuştur. Alkali koşullarda borat ve alüminatlar gibi kompleks reaktiflerin kullanılması ile laktuloz verimi % 70-80'lere çıkabilmektedir. Fakat bu reaksiyonlarda fazla miktarda katalizör ihtiyacı olmakta ve karışımdan katalizörlerin ayrılması nispeten zor olmaktadır. Bu nedenle yumurta endüstrisinde önemli bir atık olan yumurta kabuğunun değerlendirilmesine ve çevre dostu bir katalizör kullanımına olanak sağlayan bu tür çalışmalara rastlanmaktadır (Montilla vd., 2005b; Corzo Martinez vd., 2013). Aynı araştırmacılar yapmış oldukları farklı bir çalışmalarında mikrodalga destekli laktuloz izomerizasyon yönteminin verimi artırdığını bildirmişlerdir (Nooshkam ve Madadlou, 2016b).

İyon değiştirici reçineler kullanılarak laktozun laktuloza izomerizasyonu da sağlanabilmektedir. Bu işlemde OH^- iyonlarının reaksiyon çözeltisindeki ve reçinedeki değişimi kullanılmakta ve aynı prosesle son üründeki deminerilizasyon işlemi de yapılabilmektedir. Bu yöntemin avantajı, izomerizasyon işlemi için katalizör madde ilavesine ve son ürünün saflaştırılmasında boya maddesi kullanımına gerek olmamasıdır (Panesar ve Kumari, 2011).

Yapılan çalışmalardan görüldüğü üzere laktulozun saflaştırılmasında temel olarak çöktürme, iyon değiştirici reçineler, kristalizasyon, santrifügasyon; reaksiyon ortamının rengini gidermek için ise aktif karbon işlemlerinden yararlanılmaktadır. Bu yöntemler tek başına veya kombine şekilde kullanılabilmektedir. Yöntemde kullanılan materyale göre işlem basamakları değişiklik göstermektedir. Bu işlemlerde temel amaç en uygun şartlarda en yüksek saflığı yakalamaktır (Panesar ve Kumari, 2011).

Laktulozun eldesinde endüstride yoğun olarak kullanılan yöntem kimyasal izomerizasyondur. Fakat bu yöntemin bazı olumsuz yönleri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları renkli yan ürünlerin

açığa çıkması, atık yönetimi ile ilgili sorunların olması ve spesifik reaksiyonun zayıf olmasıdır. Kimyasal izomerizasyon yöntemi temelde; nötralizasyon, katalitik seperasyon ve deiyonizasyon aşamalarını içermektedir (Sitanggang vd., 2015). Kimyasal izomerizasyon yönteminin olumsuz yönleri olması nedeni ile alternatif olarak kullanılan enzimatik sentez yönteminin daha çevre dostu olduğu ve ürün saflaştırmasının daha zahmetsiz aşamalardan oluştuğu belirtilmektedir (Sitanggang vd., 2015, Wang vd., 2015).

Enzimatik sentez yönteminde genellikle β-glikozidaz ve β-galaktozidaz enzimleri kullanılarak laktuloz üretimi gerçekleştirilmektedir. Laktulozun enzimatik olarak sentezlenmesi laktozun transgalaktosilasyonu yolu ile gerçekleşmekte, bu reaksiyonda enzimler biyokatalizör, fruktoz galaktosil akseptörü olarak kullanılmaktadır (Nath vd., 2016). Laktuloz sentezinde kullanılan enzimler mikroorganizmalardan, bitki ve hayvanlardan elde edilebilmektedir. Bununla birlikte mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin diğerlerine göre daha yüksek verim sağladığı bildirilmiştir (Nath vd., 2016). Enzimatik yolla laktuloz sentezi; serbest enzim, immobilize enzim ve bütün mikroorganizma hücresinin kullanımı ile gerçekleştirilebilmektedir. Verimin düşük olması ve yüksek maliyet, enzimatik sentez yönteminin olumsuz yönleri olarak görülmektedir (Wang vd., 2015).

Yapılan çalışmalardan görüldüğü üzere her iki yöntemin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Her iki yöntem ile ilgili özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir. Farklı kimyasallar, enzimler veya kombine yöntemler kullanılarak yüksek saflıkta laktuloz eldesi için ekonomik ve çevre dostu yöntemler geliştirilmektedir.

Laktulozun enzimatik yolla sentezlenmesinde kullanılan enzim başta olmak üzere, enzimin çalışmasını etkileyen pH, sıcaklık, basınç vb. gibi proses şartları, laktuloz oluşum miktarını ve verimini etkilemektedir. Bu nedenle bu konularda farklı araştırmacılar tarafından çok sayıda çalışmanın yapıldığı görülmektedir. Song vd. (2013a) tarafından laktuloz sentezi için geliştirilen sabit yataklı reaktörde kesikli ve sürekli olarak üretim yapılmış, bu kapsamda peyniraltı suyu hammadde olarak kullanılmış, reaktöre immobilize edilen β-galaktosidaz enziminin tekrar kullanılabilirliği araştırılmış, üretim için gerekli optimum fruktoz konsantrasyonu %5'lik olarak tespit edilmiş ve laktuloz sentezinin kinetik parametreleri belirlenmiştir. Guerrero vd. (2015) *Aspergillus oryzae* suşundan elde edilen β-galaktosidaz enzimini hem serbest olarak kesikli sistemde hem de immobilize ettikten sonra tekrarlamalı kesikli sistemde laktuloz eldesi için kullanmışlardır. Sonuç olarak tekrarlamalı kesikli sistemin laktuloz üretiminde belirgin artış sağladığı ve biyokatalizör birim kütlesi başına toplam verimliliğin arttığını belirtmişlerdir.

Koyun peynirinden izole edilen *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces marxianus* suşlarından elde edilen β-galaktozidaz enzimleri ile peyniraltı suyundaki laktozun transgalaktosilasyon ile prebiyotik karbonhidratlara (tagatoz, laktuloz, galaktooligosakkarit) dönüşümünün sağlandığı araştırmada kullanılan yöntemin prebiyotik oligosakkaritlerin üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Padilla vd., 2015).

İmmobilize edilmiş β-galaktosidaz ve glukozizomeraz enzimi ile laktuloz eldesinde peyniraltı suyu tozu, sodyum fosfat tamponlu çözeltisi kullanılmış; laktoz derişimi, sıcaklık, tampon çözeltinin iyonik kuvveti ve immobilize enzimlerin kullanım oranları gibi reaksiyon koşulları optimize edilmiş olup ayrıca enzimlerin tekrar kullanılabilirliği araştırılarak enzim sarfiyatı asgari düzeye indirilmiştir. Araştırma sonucunda sürekli üretimde akış hızının arttıkça laktuloz sentezinin azaldığı gözlemlenmiş olup, 1.0 µL/dk hızda maksimum laktuloz sentezi (1.42 g/L) belirlenmiştir (Song vd., 2013b). Wang vd. (2015) laktuloz üretimi için biyokatalitik bir metot geliştirmişlerdir. Bu amaçla etanol ile muamele görmüş *E.coli* hücreleri içerisinde rekombinant sellobiyoz 2-epimeraz enzimini kullanmışlardır. Biyokatalizör olarak bütün hücre kullanımının enzim saflaştırma aşamalarında avantaj sağladığı bildirilmiştir. Bu avantajlardan bazıları, endüstriyel olarak biyolojik dönüşüm prosesinin daha basit, kolay işlenebilir ve ekonomik olması olarak belirtilmiştir. Bu işlem ile %65.1 laktuloz dönüşüm verimi ile maksimum ürün verimi 390.59 g/L olarak bulunmuştur.

Laktoz elektro katalitik izomerizasyon yöntemi ile de laktuloza dönüştürülebilmektedir. Sıcaklık, elektrik akım yoğunluğu ve reaktör tasarımı laktuloz sentezinin verimini etkileyen önemli faktörlerdir. Aissa ve Aider (2014) tarafından yapılan çalışmada % 10'luk laktoz çözeltisiyle en yüksek laktuloz verimi (%30.19) ve son ürün saflığı 10°C'de, 200 mA elektrik şiddetinde elde edilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada laktozun laktuloza elektro-izomerizasyon ile dönüşümü farklı laktoz derişimlerinde ve elektrik akımlarında peyniraltı suyu kullanılarak denenmiştir. Araştırma sonucunda laktoz konsantrasyonunun izomerizasyon

verimine önemli ölçüde etki etmediği, ancak laktoz çözeltilerindeki verimin aynı oranda laktoz içeren peyniraltı suyundan daha fazla olduğu gözlemlenmiş olup bunun sebebinin ise peyniraltı suyunda bulunan minerallerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu yöntemde en etkili parametrenin ise elektrik alan yoğunluğu (200 mA) olduğu tespit edilmiştir (Aider ve Vidal, 2012).

Geleneksel termal yöntemlere alternatif olarak kullanılan ultrasonik ses yöntemiyle laktuloz eldesinde çevre dostu ve kaliteli ürün elde edilebilmesinin yanında bu yöntemin ısısal yöntemlerle kıyaslandığında yüksek pH'lı tampon çözeltiler içinde iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan bu yöntemin ısısal muameleyle kombinasyonunda verimin arttığı belirlenmiştir (Martinez vd., 2014).

Laktuloz sentezlenmesinde verim ne kadar önemli ise elde edilen ürünün saflaştırılması, saflaştırma aşamaları ve bu aşamadaki maliyette önemlidir. Laktuloz üretimi sırasında glukoz, galaktoz ve epilaktoz gibi bazı yan ürünler kayda değer miktarda ortaya çıkmaktadır. Düşük miktarda bile oluşan galaktoz, tagatoz, epilaktoz ve formik asitin laktulozu indirgeyebildiği ifade edilmekte fakat bu durumun pH ve sıcaklığı düşürerek giderilebileceği belirtilmektedir (Nath vd., 2016).

Sonuç

Laktuloz, insan beslenmesinde, probiyotik gıdalarda özellikle bebek mamalarında ve ilaç sektöründe yoğun olarak kullanılan fonksiyonel bir prebiyotiktir. Süt endüstrisi ilerlemiş ülkelerde süt ve yan ürünlerinin değerlendirilmesi son derece hassas bir biçimde yapılmakta, her bileşeni değerlendirilmektedir. Isıl işlem görmüş süt ve süt ürünlerinde, peyniraltı suyu gibi yüksek miktarda laktoz içeren sütçülük yan ürünlerinde teknolojik proses esnasında kendiliğinden laktuloz oluştuğu bilinmektedir. Ayrıca laktuloz temel olarak kimyasal izomerizasyon (asit veya baz kullanarak) yada enzimatik sentez yöntemleri ile elde edilebilmektedir. Hem fonksiyonel hem de teknolojik açıdan hem fonksiyonel hem de teknolojik açıdan öneme sahip olan laktulozun en ekonomik ve çevre dostu işlemlerle yüksek verimde elde edilmesi ve saflaştırılması için yapılan çalışmaların devam etmesi gerektiği düşünülmektedir.

Kaynaklar

Aider, M. & Vidal, M. G. (2012). Lactulose synthesis by electro-isomerization of lactose: Effect of lactose concentration and electric current density. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 163-170.

Aissa, A.A. & Aider, M. (2014). Electro-catalytic isomerization of lactose into lactulose: The impact of the electric current, temperature and reactor configuration. *International DairyJournal*, 34, 213-219.

Akalın, S. (2002). Laktuloz üretimi, gıda ve farmakoloji endüstrisinde kullanımı. *Gıda*, 27(6), 475-478.

Akın, P. & Erden, B. (2002). Hepatik Ensefalopati. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları, Sempozyum Dizisi. 28, 111-120.

Amine, A., Moscone, D. & Palleschi, G. (2000). Rapid determination of lactulose in milk using Seliwanoff's reaction. *Analytical Letters*, 33(1), 125-135.

Boitz, L.I. & Mayer, H.K. (2015). Evaluation of furosine, lactulose and acid-soluble β-lactoglobulin as time temperature integrators for whipping cream samples at retail in Austria. *International Dairy Journal,* 50, 24-31.

Corzo-Martínez, M., Copoví, P., Olano, A., Moreno, F.J. & Montilla, A. (2013). Synthesis of prebiotic carbohydrates derived from cheese whey permeate by a combined process of isomerisation and transgalactosylation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1591-1597.

De Rafael, D., Calvo, M. & Olano, A. (1996). Determination of low levels of lactulose in milk. *Milchwissenschaft*, 51, 552-553.

Elliott, A.J., Data, N., Amenu, B. & Deeth, H. C. (2005). Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. *Journal of Dairy Research*, 72, 1-5.

Flick, J.A., Schnaar, R.L., & Perman, J.A. (1987). Thin-layer chromatographic determination of urinary excretion of lactulose, simplified and applied to cystic fibrosis patients. *Clinical Chemistry*, 33(7), 1211-1212.

Gonzáles, A.S.P., Naranjo, G.B., Malec, L.S. & Vigo, M.S. (2003). Available lysine, protein digestibility and lactulose in commercial infant formulas. *International Dairy Journal*, 13, 95-99.

Guerrero, C., Vera, C., Araya, E., Conejeros, R. & Illanes, A. (2015). Repeated-batch opera-

tion for the synthesis of lactulose with β-galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking. *Bioresource Technology*, 190, 122-131.

Kavas, G. & Kavas, N. (2011). Laktulozun sağlık üzerindeki etkileri ve kullanım alanları. *Dünya Gıda Dergisi*, 11(16), 94-97.

Marconi, E., Messia, M.C., Amine, A., Moscone, D., Vernezza, F., Stocchi, F. & Palleschi, G. (2004). Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. *Food Chemistry*, 84, 447-450.

Martinez, M.C., Montilla, A., Perez, R.M., Olano, A., Moreno, F.J. & Villamiel, M. (2014). Impact of high-intensity ultrasound on the formation of lactulose and Maillard reaction glycoconjugates. *Food Chemistry*, 157, 186-192.

Montilla, A., Moreno, F.J. & Olano, A. (2005a). A reliable gas capillary chromatographic determination of lactulose in dairy samples. *Chromatographia,* 62, 311-314.

Montilla, A., Del Castillo, M.D., Sanz, M.L. & Olano, A. (2005b). Eggshell as catalyst of lactose isomerisation to lactulose. *Food Chemistry*, 90(4), 883-890.

Nahla, T.K. & Musa, T.N. (2015). Chemical isomerization of whey lactose to lactulose by using batch reaction. *Pakistan Journal of Nutrition*, 14(5), 255-258.

Nath, A., Verasztó, B., Basak, S., Koris, A., Kovács, Z. & Vatai, G. (2016). Synthesis of lactose-derived nutraceuticals from dairy waste whey-a Review. *Food Bioprocess Technology*, 9, 16-48.

Nooshkam, M. & Madadlou, A. (2016a). Maillard conjugation of lactulose with potentially bioactive peptides. *Food Chemistry*, 192, 831-836.

Nooshkam, M. & Madadlou, A. (2016b). Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides. *Food Chemistry*, 200, 1-9.

Özden, A. (2005). Laktuloz-Prebiyotik. *Güncel Gastroenteroloji*, 9(4), 209-222.

Padilla, B., Frau, F., Ruiz-Matute, A.I., Montilla, A., Belloch, C., Manzanares, P. & Corzo, N. (2015). Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by β-galactosidases from dairy *Kluyveromyces*. *Journal of Dairy Research,* 82, 356-364.

Panesar, P.S. & Kumari, S. (2011). Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances*, 29, 940-948.

Pappas, C.S., Sakkas, L., Moschopoulou, E. & Moatsou, G. (2015). Direct determination of lactulose in heat-treated milk using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and partial least squares regression. *International Journal of Dairy Technology*, 68(3), 448-453.

Sakkas, L., Moutafi, A., Moschopoulou, E. & Moatsou, G. (2014). Assessment of heat treatment of various types of milk. *Food Chemistry*, 159, 293-301.

Silveira, M.F., Masson, L.M.P., Martins, J.F.P., Álvares, T.S., Paschoalin, V.M.F., Lázaro de la Torre, C. & Conte-Junior, C.A. (2015). Simultaneous determination of lactulose and lactose in conserved milk by HPLC-RID. *Journal of Chemistry*, 2015, 1-6.

Sitanggang, A.B., Drews, A. & Kraume, M. (2015). Influences of operating conditions on continuous lactulose synthesis in an enzymatic membrane reactor system: A basis prior to long-term operation. *Journal of Biotechnology*, 203, 89-96.

Seo, Y.H., Sung, M. & Han J.I. (2016). Lactulose production from cheese whey using recyclable catalyst ammonium carbonate. *Food Chemistry*, 197, 664-669.

Song, Y.S., Lee, H.U., Park, C. & Kim, S.W. (2013a). Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β-galactosidase. *Food Chemistry*, 136, 689-694.

Song, Y.S., Lee, H.U., Park, C. & Kim, S.W. (2013b). Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β-galactosidase and glucoseisomerase. *Carbohydrate Research*, 369, 1-5.

Wang, M., Yang, R., Hua, X., Shen, Q., Zhang, W. & Zhao, W. (2015). Lactulose production from lactose by recombinant cellobiose 2-epimerase in permeabilised *Escherichia coli* cells. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 1625-1631.