

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2419>
<https://elibrary.ru/DVBEZS>

Обзорная статья
<https://fptt.ru>

Биотехнология лактулозы: современные достижения, проблемы и перспективы



С. А. Рябцева*^{ORCID}, А. Г. Храмцов^{ORCID}, М. А. Шпак^{ORCID}, А. Д. Лодыгин^{ORCID},
Г. С. Анисимов^{ORCID}, С. Н. Сазанова^{ORCID}, Ю. А. Табакова^{ORCID}

Северо-Кавказский федеральный университет^{ORCID}, Ставрополь, Россия

Поступила в редакцию: 14.09.2022

Принята после рецензирования: 02.11.2022

Принята к публикации: 06.12.2022

*С. А. Рябцева: ryabtseva07@mail.ru,

<https://orcid.org/0000-0001-9803-8709>

А. Г. Храмцов: <https://orcid.org/0000-0002-5188-4657>

М. А. Шпак: <https://orcid.org/0000-0002-0119-9061>

А. Д. Лодыгин: <https://orcid.org/0000-0001-8460-2954>

Г. С. Анисимов: <https://orcid.org/0000-0001-9257-9571>

С. Н. Сазанова: <https://orcid.org/0000-0002-8200-3007>

Ю. А. Табакова: <https://orcid.org/0000-0002-0077-2778>

© С. А. Рябцева, А. Г. Храмцов, М. А. Шпак, А. Д. Лодыгин,
Г. С. Анисимов, С. Н. Сазанова, Ю. А. Табакова, 2023



Аннотация.

Лактулоза является пребиотиком, который широко применяется в медицине и пищевой промышленности. Производство лактулозы основано на изомеризации лактозы в щелочных средах при высоких температурах. Альтернативой являются ферментативные способы, которые считаются более экологически чистыми и позволяют проводить процессы в более мягких условиях.

Объектом исследования стали научные публикации по вопросам синтеза и очистки лактулозы с использованием ферментов. Для поиска информации были использованы базы данных Scopus, Web of Science, PubMed и Elibrary за период с 1978 по 2022 гг.

Рассмотрели два основных пути ферментативного превращения лактозы в лактулозу: изомеризация (прямой) и трансгалактозилирование (с промежуточным гидролизом). Для первого применяют целлюлозо-2-эпимеразы, которые пока не имеют статуса безопасности и их не производят в промышленных масштабах, а побочным продуктом их реакции является эпилактоза. Для трансгалактозилирования применяют β -галактозидазы, которые имеют международный статус безопасности (GRAS) и доступны на рынке, с хорошо изученным механизмом действия. Систематизировали данные об условиях получения максимальных выходов лактулозы при использовании разных ферментов.

Основными продуцентами β -галактозидаз для получения лактулозы являются дрожжи *Kluyveromyces lactis* и плесени *Aspergillus oryzae*. Выход лактулозы достигает 30 % в оптимальных условиях. Основной проблемой является необходимость внесения фруктозы. Прямой зависимости между максимальными выходами лактулозы и молярными соотношениями фруктоза:лактоза не выявлено. Применение целлобиозо-эпимераз позволяет достигать высоких выходов лактулозы (70–80 %), но для получения этих ферментов используют методы геной инженерии и мутагенеза, что ставит под сомнение их безопасность. К наиболее перспективным тенденциям развития биотехнологии лактулозы можно отнести использование вторичного молочного сырья и иммобилизованных ферментов, применение разных моделей реакторов, в т. ч. мембранных, и разработку комплексных взаимосвязанных процессов получения ферментов, конверсии лактозы в лактулозу и очистки готовых продуктов.

Ключевые слова. Лактулоза, лактоза, биоконверсия, ферменты, выход, β -галактозидаза, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, целлобиозо-2-эпимераза, тенденции

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России)^{ORCID} в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства по теме «Создание первого в России высокотехнологичного производства пребиотика лактулозы и функциональных молочных ингредиентов для импортозамещения в медицине, ветеринарии, детском питании, производстве лечебно-профилактических продуктов для людей и животных» (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации государственного научного учреждения и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства № 075-11-2022-021 от 07.04.2022 г.) и в рамках Постановления Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 на базе Северо-Кавказского федерального университета (СКФУ)^{ORCID}.

Для цитирования: Биотехнология лактулозы: современные достижения, проблемы и перспективы / С. А. Рябцева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 1. С. 97–122с. (На англ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2419>

Biotechnology of Lactulose Production: Progress, Challenges, and Prospects



Svetlana A. Ryabtseva*^{ORCID}, Andrey G. Khramtsov^{ORCID},
Maria A. Shpak^{ORCID}, Alexey D. Lodygin^{ORCID}, Georgy S. Anisimov^{ORCID},
Serafima N. Sazanova^{ORCID}, Yulia A. Tabakova^{ORCID}

North-Caucasus Federal University^{ORCID}, Stavropol, Russia

Received: 14.09.2022

Revised: 02.11.2022

Accepted: 06.12.2022

*Svetlana A. Ryabtseva: ryabtseva07@mail.ru,

<https://orcid.org/0000-0001-9803-8709>

Andrey G. Khramtsov: <https://orcid.org/0000-0002-5188-4657>

Maria A. Shpak: <https://orcid.org/0000-0002-0119-9061>

Alexey D. Lodygin: <https://orcid.org/0000-0001-8460-2954>

Georgy S. Anisimov: <https://orcid.org/0000-0001-9257-9571>

Serafima N. Sazanova: <https://orcid.org/0000-0002-8200-3007>

Yulia A. Tabakova: <https://orcid.org/0000-0002-0077-2778>

© S.A. Ryabtseva, A.G. Khramtsov, M.A. Shpak,

A.D. Lodygin, G.S. Anisimov, S.N. Sazanova, Yu.A. Tabakova, 2023



Abstract.

Lactulose is a prebiotic that has found a wide application in medicine and food industry. Commercial lactulose is usually synthesized by isomerization in alkaline media at high temperatures. Enzymatic methods offer a more sustainable alternative and require more moderate processing conditions.

This review covers 44 years of scientific publications (1978–2022) on the enzymatic synthesis and purification of lactulose. The materials were retrieved from Scopus, Web of Science, PubMed, and Elibrary databases.

The enzymatic approach to lactose-to-lactulose conversion has two methods: isomerization (direct) and transgalactosylation (via hydrolysis). Isomerization exploits cellulose-2-epimerases, but their safety status is still rather vague. As a result, cellulose-2-epimerases are not commercial. Epilactose is a by-product of isomerization. Transgalactosylation involves β -galactosidases with an official international safety status (GRAS). It is available on the market, and its action mechanism is well understood. This article systematizes various data on the conditions for obtaining the maximal yields of lactulose by different enzymes. The *Kluyveromyces lactis* yeast and the *Aspergillus oryzae* mold are the main sources of β -galactosidases in lactulose production. The yield can reach 30% if the processing conditions are optimal. Fructose remains the main problem in the production process. No scientific publications revealed a direct relationship between the maximal yields of lactulose and the molar fructose-to-lactose ratios. Cellobiose epimerases make it possible to achieve high yields of lactulose (70–80%). However, these enzymes are associated with genetic engineering and mutagenesis, which challenges their safety status. The most promising trends in lactulose biotechnology include secondary dairy raw materials, immobilized enzymes, membrane reactors, complex production processes, lactose-to-lactulose conversion, and purification of final product.

Keywords. Lactulose, lactose, bioconversion, enzymes, yield, β -galactosidase, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, cellobiose-2-epimerase, trends

Funding. The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauka)^{ORCID} as part of a comprehensive high-tech production project on the topic “The first Russian high-tech production of lactulose prebiotic and functional dairy ingredients for import substitution in medicine, veterinary, baby food, and medical preventive products for people and animals”, Decree No. 218 of the Government of the Russian Federation of April 9, 2010. The subsidies were allocated from the Federal Budget for the development of cooperation between state scientific institutions and the real sector of the economy as part of a comprehensive high-tech production project No. 075-11-2022-021 of 04/07/2022. The research was conducted on the premises of the North-Caucasus Federal University (NCFU)^{ORCID}.

For citation: Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Shpak MA, Lodygin AD, Anisimov GS, Sazanova SN, et al. Biotechnology of Lactulose Production: Progress, Challenges, and Prospects. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(1):97–122c. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2419>

Введение

Лактулоза (β -D-галактопиранозил-(1,4)- β -D-фруктофураноза) является наиболее изученным неперевариваемым дисахаридом-пребиотиком. Ее способность избирательно стимулировать рост и/или метаболизм полезной микрофлоры кишечника, особенно бифидобактерий и лактобацилл, и оказывать положительное влияние на здоровье человека подтверждена многочисленными исследованиями. Фармацевтические препараты лактулозы более 50 лет применяют для лечения хронических запоров и печеночной энцефалопатии, а в последние десятилетия – в терапии остеопорозов, пищевых отравлений и инфекций [1, 2]. Появляется все больше информации о возможности применения этого уникального углевода для укрепления иммунитета, уменьшения воспалительных процессов и предупреждения канцерогенеза [3–5].

В медицине лактулозу применяют в высоких концентрациях – более 10–15 г/сутки. Однако введение в рацион даже 2 г лактулозы в сутки дает положительный результат, включая повышенную выработку полезных метаболитов и улучшение всасывания минералов в кишечнике, без побочных эффектов [6]. Добавление небольших доз лактулозы в различные пищевые продукты позволяет не только придать им полезные для здоровья (функциональные) свойства, но и получить ряд дополнительных экономических и технологических преимуществ, таких как сокращение длительности ферментации, повышение жизнеспособности заквасочных культур и увеличение сроков хранения продукции, улучшение ее органолептических показателей и снижение калорийности за счет частичной замены сахара. Благодаря этому лактулоза используется в молочной, кондитерской, хлебобулочной и других отраслях пищевой промышленности. Еще одно перспективное направление применения лактулозы – ее включение в состав оболочек микро- и наночастиц для доставки пробиотиков, витаминов и других полезных веществ в нижние отделы кишечника [1, 7].

Лактулоза считается одним из самых ценных производных лактозы – основного углевода молока, который составляет значительную долю сухих веществ побочных продуктов производства сыра, творога, казеина и масла. Как и другие продукты переработки пищевого сырья с высокой добавленной стоимостью, лактулоза представляет интерес как в плане осуществления замкнутого производственного цикла переработки, так и с точки зрения устойчивой экономики и охраны окружающей среды [8].

Современное промышленное производство лактулозы основано на изомеризации лактозы в щелочных средах (рН на уровне 11) при высоких температурах (70–80 °С). Поэтому при проведении реакции образуются побочные продукты

карамелизации и сахариновые кислоты, а в присутствии белков и пептидов – меланоидины. При использовании в качестве катализаторов гидроксидов натрия или кальция максимальная степень изомеризации находится на уровне 30 %. Гидроксиды можно удалить путем электродиализа, а оставшуюся лактозу обычно кристаллизуют. Однако этот процесс протекает медленно из-за сложного состава получившейся смеси. Выход лактулозы можно увеличить до 70–80 % с помощью комплексообразующих катализаторов (алюминатов или боратов). Однако они токсичны и полное их удаление требует селективной ионообменной обработки. Получаемые сиропы лактулозы содержат остатки лактозы, глюкозы, галактозы, фруктозы, эпилактозы и других углеводов, тонкая очистка от которых проводится обычно хроматографическими методами [9, 10].

Вариантом химической изомеризации лактозы являются способы с применением ее электроактивированных растворов (католитов), в которых щелочная среда формируется без внесения реагентов [9, 10]. В недавно опубликованной работе А. Karim и М. Aider показано, что при электроактивации сывроточного пермеата, полученного методом ультрафильтрации, и оптимальных условий обработки степень изомеризации лактозы в лактулозу достигала 37 % [11]. Может возникнуть проблема вспенивания вторичного молочного сырья при электроактивации, а также сохраняется необходимость удаления непрореагировавшей лактозы, других сахаров и побочных продуктов реакции.

Альтернативой химическим методам получения и очистки лактулозы являются способы, основанные на применении ферментов – белков, выполняющих роль катализаторов метаболических реакций в живой клетке. Промышленные ферменты микробного происхождения используются во всем мире в фармацевтической и пищевой биотехнологии. Такие процессы считаются экологически чистыми, т. к. ферменты производят из возобновляемых ресурсов, они могут быть использованы повторно, а также являются биоразлагаемыми. Ферменты способны катализировать реакции в мягких условиях, близких к физиологическим, что выгодно с точки зрения энергопотребления [10, 12].

Еще одно преимущество биосинтеза лактулозы – это возможность использования в качестве источников лактозы вторичное молочное сырье, в т. ч. подсырную и/или творожную сывротку, ультрафильтрационные пермеаты обезжиренного молока и сывротки. К достоинствам применения ферментов относятся их селективность и возможность проведения процесса получения лактулозы при низких температурах и близких к нейтральным значениям рН, в результате чего образуется меньше побочных продуктов реакции. Это позволяет снизить расходы

на очистку лактулозы и соответствует современным требованиям к экологически безопасным технологиям и натуральным продуктам [13, 14].

Эксперты считают, что неправильные пищевые привычки, потребности спортсменов и пожилых людей будут стимулировать рост производства лактулозы, а высокие темпы инвестиций в исследования в пищевой промышленности – способствовать росту доходов мирового рынка лактулозы в течение 2022–2028 гг. [15]. В нашей стране растущий спрос на лактулозу пока удовлетворяют иностранные фирмы, поэтому актуальной является задача организации ее отечественного производства [1].

Целью работы является систематизация и анализ информации о ферментативных способах получения лактулозы для определения перспективных направлений исследований в этой области.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования стали научные публикации по вопросам получения лактулозы с использованием ферментов. Для поиска информации были использованы базы данных Scopus, Web of Science, PubMed и Elibrary за период с 1978 г. (появление первой публикации по теме) по первое августа 2022 г. Отобрали и проанализировали все доступные обзорные и исследовательские статьи по ферментативному синтезу лактулозы и отдельные статьи, связанные с обоснованием актуальности темы, пониманием свойств и механизмов действия ферментов и определением перспективных направлений исследований в этой области, на английском и русском языках. Основное внимание уделялось статьям, опубликованным в научных рецензируемых журналах с высоким индексом цитирования за последние пять лет. Материалы конференций и главы из книг при проведении анализа не использовали.

Результаты и их обсуждение

1. Основные процессы, применяемые ферменты и возможные механизмы образования лактулозы. Биотехнология лактулозы, как и других функциональных углеводов, включает три основных взаимосвязанных процесса: производство фермента, ферментативный синтез продукта и последующую обработку [16]. В большинстве отобранных для анализа публикаций для получения лактулозы авторы использовали уже готовые коммерческие очищенные ферментные препараты (в свободной или иммобилизованной форме), но в некоторых работах описано приготовление необходимых ферментов с разной степенью очистки.

Теоретически для биоконверсии лактозы в лактулозу существует два основных пути: прямой и с промежуточным гидролизом. Для первого

необходима изомераза, которая бы трансформировала глюкозный остаток лактозы во фруктозный. Подобная способность была обнаружена около 10 лет назад у целлюлозо-2-эпимераз (далее эпимераз) разного происхождения. Однако эти ферменты пока не имеют статуса безопасности и их не производят в промышленных масштабах, а побочным продуктом реакции является эпилактоза.

Второй путь, более сложный, предполагает применение ферментов, которые сначала расщепляют лактозу до галактозы и глюкозы, а затем могут присоединять галактозный остаток к фруктозе, т. е. проводить трансгалактозилирование. Такими свойствами обладают некоторые гликозидазы, в т. ч. имеющие международный статус безопасности и доступные на рынке [10, 12, 14]. В связи с этим второй путь ферментативного синтеза лактулозы привлекает внимание ученых уже более 20 лет и сохраняет свою актуальность. Это подтверждается ростом количества публикаций по этой теме, в то время как перспективы применения эпимераз пока не ясны (рис. 1).

Согласно международной классификации ферментов гликозидазы имеют код ЕС 3.2.1, т. е. относятся к классу «Гидролазы», подклассу «Гликозилазы» и подгруппе, в которую входят белки, катализирующие гидролиз O- и S-гликозильных соединений. Для биосинтеза лактулозы используют бета-галактозидазы (β -галактозидазы, лактазы, ЕС 3.2.1.23), которые могут гидролизовать концевые не восстанавливающие остатки бета-D-галактозы в бета-D-галактозидах. Эти ферменты широко распространены в природе. В классификаторах упоминается

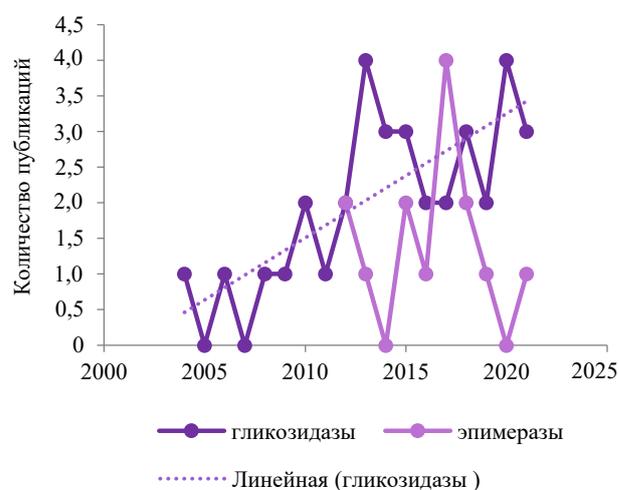


Рисунок 1. Распределение количества публикаций о биосинтезе лактулозы по годам

Figure 1. Publications on the biosynthesis of lactulose, by years

593 вида организмов, способных их вырабатывать, включая разные виды бактерий, грибов, растений и животных [17].

Бета-галактозидазы применяют в молочной промышленности для гидролиза лактозы с целью получения низко- и безлактозных продуктов для людей с лактазной недостаточностью, а также для предотвращения кристаллизации лактозы в сгущенных продуктах и производства сладких глюкозо-галактозных сиропов и галактоолигосахаридов-пребиотиков. Обычно используют коммерческие препараты β -галактозидаз из признанных безопасными источников: дрожжей рода *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces fragilis*) и плесеней *Aspergillus* (*Aspergillus oryzae* и *Aspergillus niger*). Для производства галактоолигосахаридов применяют также коммерческие препараты β -галактозидаз из бактерий *Bacillus circulans* и *Escherichia coli*. Исследованы процессы синтеза с использованием дрожжей *Rhodotorula minuta*, молочнокислых кокков и палочек, бифидобактерий и других микроорганизмов [18–21].

Процесс производства бета-галактозидазы включает культивирование выбранной чистой культуры в селективных средах при оптимальных условиях, выделение, очистку фермента и получение ферментного препарата. Процесс культивирования состоит из трех стадий: получение и активизация посевного материала (инокуляции), выращивание биомассы посевного материала и основная ферментация, при которой происходит как рост микроорганизмов, так и биосинтез фермента. Процесс выделения фермента состоит из предварительной обработки, разделения твердой и жидкой фаз, фильтрации, концентрирования, стабилизации и заключительной очистки ферментов. Если фермент накапливается внутри клеток, то клетки продуцента лизируют, если выделяется в ферментационную среду, то он отделяется от клеток продуцента в процессе разделения твердой и жидкой фаз. Клеточный материал обычно отделяют от ферментов с помощью процесса мембранной фильтрации. Например, ультрафильтрации (УФ). Чтобы получить жидкий ферментный препарат, его стабилизируют (например, глицерином). Когда получают сухой ферментный препарат, УФ-концентрат высушивают распылением и дополнительно гранулируют. Например, с мальтодекстрином или мукой. Готовый продукт анализируют в соответствии с общими спецификациями для ферментных препаратов, используемыми в пищевой промышленности [20].

Механизм действия β -галактозидазы включает три этапа: образование комплекса с лактозой, образование галактозильного комплекса с ферментом с высвобождением глюкозы и перенос галактозы к нуклеофильному акцептору, содержащему гидроксильную группу. Если акцептором является

вода, то образуется галактоза, если углевод – транс олигосахарид. Способность β -галактозидазы принимать в активном центре нуклеофилы, отличные от воды, определяет возможность образования лактулозы (в присутствии фруктозы) или более сложных транс олигосахаридов. Эта способность определяется третичной структурой фермента и аминокислотами, образующими активный центр, концентрацией лактозы, являющейся донором для образования галактозил-ферментного комплекса, и концентрацией фруктозы, являющейся акцептором галактозила [22].

Процессы, в которых гидролазные ферменты играют роль псевдотрансфераз, считаются кинетически контролируемым синтезом. Такие реакции дают кратковременные максимальные выходы, которые зависят от соотношения скоростей синтеза целевого продукта и гидролиза активированного донора. Результат процесса полностью определяется свойствами биокатализатора, поэтому выбор фермента и формы его использования является критически важным. Для упрощения восстановления и повторного использования фермента, повышения его стабильности, активности и специфичности может быть использована иммобилизация [23].

Для биосинтеза лактулозы применяют также другой фермент группы гликозидаз – бета-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.21) [24, 25]. Она обладает специфичностью по отношению к бета-D-глюкозидам, широко распространена в природе (467 известных организмов-продуцента), рассматривается как ключевой фермент для деградации лигноцеллюлозы и используется для синтеза гликоконъюгатов и олигосахаридов [17].

Эпимеразы – принципиально другие ферменты, относящиеся к классу «Изомеразы». Известно их применение для получения лактулозы целлобиозо-2-эпимеразы (ЕС 5.1.3.11), которая относится к подгруппе ферментов, катализирующих взаимное превращение между остатками D-глюкозы и D-маннозы на восстанавливаемом конце бета-1,4-связанных дисахаридов путем эпимеризации гидроксильной группы в положении С-2 остатка глюкозы [17]. Впервые целлобиозо-2-эпимераза была обнаружена в культуральной жидкости анаэробных рубцовых бактерий *Ruminococcus albus* и названа так из-за способности катализировать эпимеризацию целлобиозы с образованием 4-O- β -D-глюкопиранозил-D-маннозы. Фермент целлобиозо-2-эпимераза способен катализировать взаимные превращения моносахаридов, дисахаридов и трисахаридов и является единственной идентифицированной эпимеразой, которая работает на незамещенных дисахаридах [26].

Целлобиозо-эпимеразы стали изучать недавно. Пока они обнаружены только в бактериях, включая анаэробы и аэробы. Большинство целлобиозо-эпимераз проявляют только эпимеризационную

активность. Однако некоторые из них, полученные из термофильных микроорганизмов (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Caldicellulosiruptor obsidiansis*, *Dictyoglomus turgidum* и *Spirochaeta thermophila*), дополнительно обладают изомеризационной активностью и способны превращать остаток глюкозы или маннозы дисахаридов во фруктозу. Следовательно, они могут быть использованы для синтеза лактулозы из лактозы [27]. В последние годы появились сведения о том, что мезофильные эпимеразы также проявляют активность изомеризации и могут применяться для биоконверсии лактулозы [28]. Точный механизм этой реакции неизвестен, но считается, что изомеризационная активность большинства целлобиозо-эпимераз ниже их эпимеризационной активности (менее 10 %), и лактоза сначала превращается в эпилактозу, а затем в лактулозу. Исключения составляют целлобиозо-эпимеразы, направленный мутагенез которых снижает выход эпилактозы или вовсе блокирует ее образование [29–31].

В связи с тем что продуцентами целлобиозо-эпимераз являются бактерии, недостаточно изученные в плане безопасности, процесс получения этих ферментов подразумевает использование методов геномной инженерии и включает следующие этапы: выделение геномной ДНК фермента из клеток продуцента, экспрессию гена в клетки хозяина (например, *E. coli* и *Bacillus subtilis*), выращивание полученной культуры в селективных средах при оптимальных условиях, выделение, очистку фермента и получение ферментного препарата. Процесс культивирования рекомбинантных клеток *E. coli* и *B. subtilis* проводят в селективной среде с добавлением канамицина или ампициллина до достижения требуемой оптической плотности ($OD_{600} = 0,6–0,8$). Затем добавляют изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид (IPTG) с целью инактивации lac-репрессора и индукции синтеза целлобиозо-эпимеразы. Целлобиозо-эпимераза является внутриклеточным ферментом, поэтому клетки в конце ферментации разрушают ультразвуком либо добавлением лизоцима, а затем разделяют твердую и жидкую фазы. Для очистки фермента широко используют хроматографию, чаще всего аффинную, реже – ультрафильтрацию. Проведение очистки фермента удорожает и усложняет технологию его получения, поэтому наибольший интерес представляет использование неочищенных ферментов или целых клеток бактерий. Готовый ферментный препарат анализируют на степень чистоты с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и определяют его активность [28, 29, 31–37].

Публикации о применении эпимераз для получения лактулозы составляют менее четверти всех выявленных публикаций по теме. Причем все они



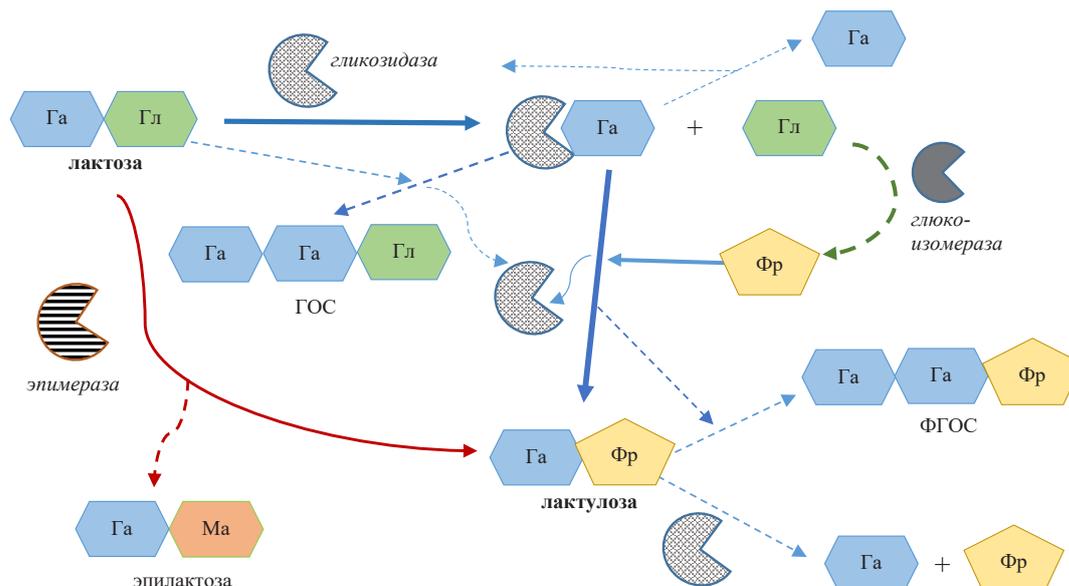
Рисунок 2. Распределение количества публикаций о биосинтезе лактулозы по ферментам и их продуцентам
Figure 2. Publications on the biosynthesis of lactulose by enzymes and their producers

имеют бактериальное происхождение (рис. 2). В качестве продуцентов гликозидаз чаще всего (более 60 % публикаций) были использованы β -галактозидазы грибного происхождения. Причем ферменты из одноклеточных почкующихся микромицет (дрожжей) исследованы в большем количестве статей, чем из мицелиальных грибов (плесеней). Среди работ с бактериальными гликозидазами 8 были посвящены β -галактозидазам, 2 – бета-глюкозидазам.

Процессы биосинтеза лактулозы являются сложными: они могут сопровождаться другими ферментативными реакциями и образованием разных углеводов. В определенных условиях некоторые гликозидазы могут также катализировать реакции переноса галактозного остатка на лактозу с образованием галактоолигосахаридов и/или на лактулозу с образованием фруктогалактоолигосахаридов. Кроме того, образовавшаяся лактулоза может подвергаться гидролизу до галактозы и фруктозы. Необходимая для биосинтеза фруктоза может быть внесена в реакционную смесь как отдельное вещество или получена путем изомеризации образовавшейся при гидролизе лактозы глюкозы с использованием глюкоизомераз [10, 12, 14].

Общая схема основных путей получения лактулозы с использованием ферментов и возможные побочные реакции показаны на рисунке 3.

Важным завершающим процессом биотехнологии лактулозы является ее выделение из реакционной смеси, которая содержит фермент (белок) и остаток лактозы. В зависимости от применяемого сырья и условий реакции в растворе могут содержаться минеральные и азотистые вещества, моносахара (глюкоза, галактоза, фруктоза), олигосахариды (эпилактоза, галактоолигосахариды, фруктогалактоолигосахариды) и другие побочные продукты. На завершающую обработку (downstream processing) в биосинтезах функциональных



Га – галактоза, Гл – глюкоза, Фр – фруктоза, Ма – манноза, ГОС – галактоолигосахариды, ФГОС – фруктогалактоолигосахариды; целевые реакции показаны сплошными линиями, дополнительные и побочные – штриховыми.

Рисунок 3. Основные пути биоконверсии лактозы в лактулозу

Figure 3. Bioconversion routes from lactose to lactulose

олигосахаридов приходится от 50 до 70 % общих производственных затрат, а для продуктов высокой чистоты затраты могут быть выше [16].

Выход лактулозы влияет на стоимость очистки и зависит от большого количества факторов, связанных со свойствами используемых субстратов и ферментов, а также с условиями проведения реакции. Данные об условиях биосинтеза лактулозы в публикациях приведены в различных единицах измерения, а для оценки результатов реакции используются различные показатели, которые трудно сопоставить. Ряд публикаций, в которых сделана попытка обобщить данные исследований в области биотехнологии лактулозы, содержат неполные, отрывочные и/или противоречивые сведения [7, 10, 12, 13, 38, 39]. В связи с этим мы провели работу по уточнению условий максимального выхода лактулозы и выявлению наиболее важных влияющих на него факторов при использовании разных групп ферментов.

2. Применение β -галактозидаз микромицет (дрожжей и плесеней). Впервые о биосинтезе лактулозы с использованием дрожжевой β -галактозидазы было сообщено в 1978 г. [40]. В 2004 г. были представлены результаты исследования потенциала коммерческих β -галактозидаз разного происхождения (из дрожжей *K. lactis* и *K. fragilis*, плесени *A. oryzae* и бактерий *E. coli*) для синтеза лактулозы.

Фермент из *K. lactis* давал самый высокий выход лактулозы в испытанных условиях [41]. С этого времени было опубликовано более 30 статей, в которых рассмотрены процессы биосинтеза лактулозы с использованием β -галактозидаз микромицет. В качестве продуцентов были использованы представители двух родов – *Kluyveromyces* и *Aspergillus*.

Результат реакций, катализируемых ферментами, зависит как от их свойств (в т. ч. от происхождения и формы), так и от условий проведения реакции (состава и концентрации исходной смеси (субстрата), температуры и pH, времени ферментации и др.). Данные об условиях процессов, при которых были получены максимальные концентрации лактулозы, представлены в таблице 1 (последовательность изложения здесь и далее в таблицах – по времени публикации).

Анализ таблицы 1 показал, что основными продуцентами β -галактозидаз для получения лактулозы являются дрожжи *K. lactis* и плесени *A. oryzae*. Хотя выходы лактулозы варьируются для ферментов разных продуцентов, более высокие выходы лактулозы были получены с β -галактозидазами плесеней. Это может быть связано с различиями в структуре ферментов. Синтез лактулозы осуществляли с использованием коммерческих препаратов β -галактозидазы, поскольку большинство из них имеет статус безопасности (GRAS или эквивалент)

Таблица 1. Условия получения максимальных выходов лактулозы с использованием β -галактозидаз микромицет
 Table 1. Conditions for the maximal yields of lactulose using micromycetec β -galactosidases

Продуцент	Фермент (препарат, форма применения)	Состав субстрата, % вес/объем	Условия процесса	$Y_{\text{лп}}^*$ %*	Источник
Продуценты – дрожжи рода <i>Kluyveromyces</i>					
<i>K. fragilis</i>	Свободный	Раствор лактозы 12 % и фруктозы 20 %	pH = 7,2, 37 °C Период.**	7,5	[40]
<i>K. lactis</i>	Novo Nordisk Свободный	Раствор лактозы 15 % и фруктозы 5 %	pH = 6,5, 37 °C, 2 ч Период.	6,1	[41]
<i>K. fragilis</i>	Sigma Свободный	Раствор лактозы 15 % и фруктозы 5 %	pH = 7,3, 30 °C, 5 ч Период.	3,5	[41]
<i>K. lactis</i> ATCC 8585	Свободный из необработанных клеток, из клеток, пермеабелизованных с 50 % (об/об) этанолом	Раствор лактозы 40 % и фруктозы 20 %	pH = 7,0, 60 °C, 3 ч Период.	4 5	[41]
<i>K. lactis</i>	Maxilact 2000 Свободный	Раствор лактозы 20 % и фруктозы 15 %	pH = 6,5, 40 °C, 1 ч Период.	16,5	[42]
<i>K. fragilis</i>	Lactozym 2000L Свободный	Раствор лактозы 20 % и фруктозы 15 %	pH = 6,5, 40 °C, 45 мин Период.	18,5	[42]
<i>K. lactis</i>	Lactozym 3000L Свободный	Раствор лактозы 10 % и фруктозы 30 %	pH = 6,7, 40 °C, 2 ч Период.	12,4	[43]
<i>K. lactis</i>	Novozyme Свободный	Раствор лактозы 80 % и фруктозы 50 % в двухфазной среде циклогексан:вода 95:5	pH = 7, 30 °C, 2 ч Период.	13	[44]
<i>K. lactis</i>	Lactozym 3000L HP G Свободный	Раствор лактозы 33 % и фруктозы 17 %	pH = 6,5, 40 °C Период.	15,3	[45]
<i>K. lactis</i>	Maxilact 5000 Свободный	Раствор лактозы 20 % и фруктозы 20 %	pH = 6,8, 38 °C Период.	7,7	[46]
<i>K. lactis</i>	Sigma, иммобилизация на углеродных нанотрубках	Сыворотка лактозы 20 % и фруктозы 20 %	pH = 7,5, 47 °C Неперер.**	7,1	[47]
<i>K. lactis</i>	Sigma, иммобилизация на силикагеле	Раствор лактозы 40 % и фруктозы 20 %	pH = 7,5, 47 °C Период.	3,9	[48]
<i>K. lactis</i>	Sigma, иммобилизация на силикагеле	Сыворотка лактозы 20 % и фруктозы 20 %	pH = 7,5, 47 °C Период. Неперер.	5,4 9,6	[49]
<i>K. lactis</i>	Maxilact 5000 Свободный	Раствор лактозы 25 % и фруктозы 10 %	pH = 7,5, 40 °C Период.	12	[50]
<i>K. lactis</i>	Lactozym 3000L HP G Свободный	Раствор лактозы 12 % и фруктозы 36 %	pH = 6,7, 40 °C Период.	8,7	[51]
<i>K. lactis</i>	Lactozym 2600L Свободный	Раствор лактозы 24,5 % и фруктозы 25,5 %	pH = 6,8, 40 °C Период. Неперер.	6,9 5,2	[52, 53]
<i>K. lactis</i>	Lactozym 2600L Свободный	Раствор лактозы 12 % и фруктозы 36 %	pH = 6,8, 40 °C Неперер.	6,2	[54]
<i>K. lactis</i>	Biolactase-NL Enzeco Lactase NL Maxilact L200 Lactozym Pure 2600L Все в свободной форме	Раствор лактозы 1,68 % и фруктозы 38,2 %	pH = 7,0, 40 °C Период.	19 23 24 20	[55]
<i>K. lactis</i>	Maxilact 5000 Свободный Свободный + Mg ²⁺ Иммобилизация на хитозане с глутаровым альдегидом	Раствор лактозы 15 % и фруктозы 30 % Подсырная сыворотка и фруктоза 30 %	pH = 7,5, 40 °C Период.	6,9 15,1 11,5	[56]
<i>K. lactis</i>	Biolactase Свободный Lactozym Свободный	УФ-пермеат лактозы 5,2 % и фруктозы 9 %	pH = 6,0, 6 °C, 72 ч Период.	21 22	[57]

Продолжение табл. 1.

Продуцент	Фермент (препарат, форма применения)	Состав субстрата, % вес/объем	Условия процесса	Y _{лп} , %*	Источник
<i>K. lactis</i>	Lactozym Свободный	УФ-пермеат лактозы 5,5 % и фруктозы 11,7 % Раствор лактоза 4,4 % + фруктоза 9 %	pH = 6,6, 6 °C, 48 ч	17,5	[58]
	Biolactase Свободный		Период. pH = 6,6, 6 °C, 72 ч	21	
<i>K. lactis</i>	Неочищенный, иммобилизация на хитозане с глутаровым альдегидом	Подсырная сыворотка лактозы 6,5 % и фруктозы 30 %	pH = 7, 50 °C Период.	26,7	[59]
<i>K. lactis</i>	Lactozym, иммобилизация на хитозане с агарозой и полиэтиленгликолем	Раствор лактозы 10 % и фруктозы 10 % Подсырная сыворотка лактозы 10 % и фруктозы 10%	pH = 7, 50 °C	13,8	[23]
			Период.	28	
Продуценты – плесени рода <i>Aspergillus</i>					
<i>A. oryzae</i>	Sigma Свободный	Раствор лактозы 15 % и фруктозы 5 %	pH = 4,5, 30 °C, 6 ч Период.	1,7	[41]
<i>A. oryzae</i>	Sigma-Aldrich Свободный	Раствор лактозы 3,4 % и фруктозы 27 %	pH = 5, 37 °C Период.	30,3	[24]
<i>A. oryzae</i>	Ha-Lactase Свободный	УФ-пермеат лактозы 20 % и фруктозы 15 %	pH = 6,5, 40 °C, 50 мин Период.	32,8	[42]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Свободный	Раствор лактозы 3,1 % и фруктозы 46,9 %	pH = 4,5, 40 °C Период.	28,2	[45]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase, Fungal lactase for alternative strains, Tolerase Все в свободной форме	Раствор лактозы 1,68 % и фруктозы 38,2 %	pH = 4,5, 40 °C	25	[55]
			Период.	25	
<i>A. niger</i>	Klerzyme 150 (DSM) Свободный Rapidase (DSM) Свободный	Раствор лактозы 1,68 % и фруктозы 38,2 %	pH = 3,5, 40 °C	20	[55]
			Период.	23	
<i>A. aculeatus</i>	Pectinex Ultra (Novo- zymes) Свободный	Раствор лактозы 1,68 % и фруктозы 38,2 %	pH = 3,5, 40 °C Период.	20	[55]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Свободный Иммобилизация с глутаровым альдегидом	Раствор лактозы 2,1 % и фруктозы 47,9 %	pH = 4,5, 50 °C	31	[60]
			Период.	25,4	
<i>A. oryzae</i>	Sigma-Aldrich Свободный	Раствор лактозы 16 % и фруктозы 34 %	pH = 4,6, 40 °C Непер.	5,5	[61]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Свободный Иммобилизация на глиоксил-агарозе, амино-глиоксил-агарозе хелат-глиоксил-агарозе	Раствор лактозы 4 % и фруктозы 46 % (1:20)	pH = 4,5, 50 °C	34	[62]
			Период.	30	
				28	
				32	
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Свободный Иммобилизация на глиоксил-агарозе	Раствор лактозы 5,3 % и фруктозы 44,7 % (1:16)	pH = 4,5, 50 °C	32	[63]
			Период.	34	
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Иммобилизация на глиоксил-агарозе	Раствор лактозы 7 % и фруктозы 43 % (1:12)	pH = 4,5, 50 °C Непер.	60	[64]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Свободный	УФ-пермеат лактозы 5,2 % и фруктозы 9 %	pH = 6, 6 °C, 48 ч. Период.	27	[57]
<i>A. niger</i>	Maxilact A4 Свободный	УФ-пермеат лактозы 5,2 % и фруктозы 9 %	pH = 4,5, 6 °C, 48 ч. Период.	13	[57]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Свободный	УФ-пермеат лактозы 5,8 % и фруктозы 23 %	pH = 4,6, 6 °C, 48 ч Период.	17,8	[58]

Продуцент	Фермент (препарат, форма применения)	Состав субстрата, % вес/объем	Условия процесса	$Y_{\text{л}}^*$, %*	Источник
Продуценты – плесени рода <i>Aspergillus</i>					
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Иммобилизация на глиоксил-агарозе	Раствор лактозы 9,6 % и фруктозы 40,4 % (1:8)	pH = 4,5, 50 °C Непрер.	54	[65]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Иммобилизация путем агрегации и сшивания с использованием этанола и пропанола	Раствор лактозы 9,6 % и фруктозы 40,4 % (1:8)	pH = 4,5, 50 °C Период.	24	[66]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Иммобилизация на агарозе четвертичного аммония	Раствор лактозы 7 % и фруктозы 43 % (1:12)	pH = 6, 50 °C Период.	24	[67]
<i>A. oryzae</i>	Enzeco® fungal lactase Свободный	Раствор лактозы 9,6 % и фруктозы 40,4 % (1:8)	pH = 4,5, 50 °C Период.	21	[68]

* выход лактулозы, % от исходной лактозы, расчетное значение по данным публикации;

** Период. – периодический способ, Непрер. – непрерывный способ ферментации.

* lactulose yield, % of initial lactulose, calculated value is based on published data;

** Periodic – periodic method, Continuous – continuous fermentation.

и производятся в промышленных масштабах (фирма США и странами Евросоюза, а также Бразилии и Китая).

Максимальное значение выхода лактулозы с дрожжевыми лактазами было получено недавно и достигло 28 % [23]. Только в одной работе с β -галактозидазой *K. lactis* результаты ферментативного синтеза были лучше и превышали результаты химического синтеза: максимальный выход лактулозы с использованием в качестве катализаторов сульфата и гидроксида натрия составил 10,3 %, борной кислоты и триэтиламина – 4,7 %, а препарата – 50,3 % [69]. Однако в статье не приведены точные условия получения таких высоких показателей биосинтеза, поэтому в таблицу 1 она не вошла. Во всех остальных публикациях по этой теме показано, что ферментативные способы получения лактулозы пока являются менее эффективными, чем основанные на химической реакции изомеризации лактозы в щелочных средах с комплексообразующими реагентами (алюминатами и боратами).

В случае применения ферментов из плесеней максимальный выход был достигнут с *A. oryzae* (60 %) [64]. Однако такой высокий выход был кратковременным. Все остальное время реакции, как и в большинстве работ с ферментами плесеней, стабильно высокий выход лактулозы находился на уровне 30 %.

Важным фактором, оказывающим влияние на выход лактулозы, является углеводный состав исходного субстрата, особенно соотношение концентраций лактозы и фруктозы в растворе. Теоретически при увеличении концентрации фруктозы

повышается вероятность того, что именно она (а не вода или лактоза) будет действовать как акцептор галактозила. Выход лактулозы увеличивается в три раза при увеличении молярного соотношения фруктоза:лактоза ($m_{\text{ф}}/m_{\text{л}}$) от 1 до 8, а самые высокие выходы лактулозы (более 30 %) были получены при соотношении $m_{\text{ф}}/m_{\text{л}}$ 8, 12, 16 и 20 [27, 45, 62, 64, 65, 67]. Однако прямой зависимости между максимальными выходами лактулозы, полученными в работах [23, 24, 40–68], и использованными молярными соотношениями фруктозы и лактозы не наблюдается (рис. 4). Сведение этих данных в единую диаграмму является допустимым, несмотря на использование в экспериментах разных условий реакции (pH, температура, общая концентрация углеводов и др.). Это обусловлено характером реакции (кинетически контролируемая), для которой главным фактором является происхождение фермента, а не условия проведения процесса [23, 45, 55].

Анализ рисунка 4 показал, что повышение значений $m_{\text{ф}}/m_{\text{л}}$ до 20 и более не приводит к существенному росту выхода лактулозы. Более того, целесообразно рассматривать область низких соотношений $m_{\text{ф}}/m_{\text{л}}$ (до 5) как наиболее перспективную с точки зрения себестоимости продукта. Внесение большого количества фруктозы приводит к повышению стоимости затрат на сырье. Большая часть фруктозы не участвует в синтезе лактулозы и остается в растворе, что затрудняет процессы ее очистки. Работы с дрожжевыми ферментами проводились при более низких значениях $m_{\text{ф}}/m_{\text{л}}$, чем с ферментами плесеней, т. е. были более практически ориентированными.

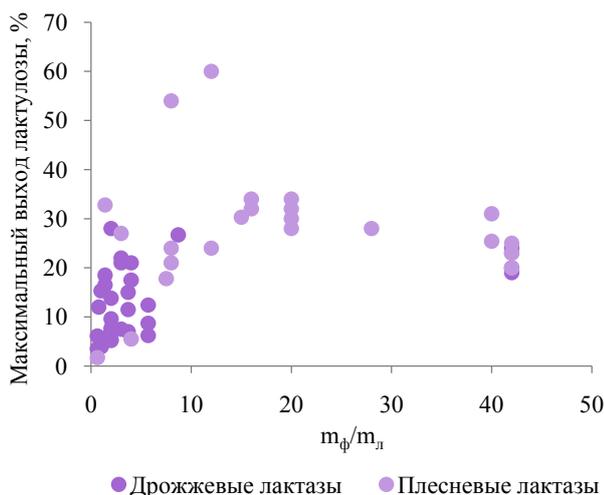


Рисунок 4. Зависимость максимального выхода лактулозы от отношения молярных концентраций фруктозы и лактозы (m_f/m_l) при использовании β -галактозидаз из микромицет

Figure 4. Maximal lactulose yield at the ratio of molar concentrations (m_f/m_l) when using micromycetic β -galactosidases

В одной из первых работ, выполненной с дрожжевыми β -галактозидазами, было установлено, что при увеличении m_f/m_l с 0,5 до 1 максимальный выход лактулозы повышается в 1,6 раза, а при увеличении m_f/m_l до 2 дальнейшего повышения выхода лактулозы не происходит [41]. Повышение общей концентрации углеводов с 37,5 до 60 % привело к увеличению выхода лактулозы в 1,5 раза и защищало фермент от денатурации при 60 °С, но снижало скорость реакции из-за повышенной вязкости раствора. В этой же работе впервые была высказана идея о возможности регулирования соотношения получаемых в результате реакции синтеза лактулозы и галактоолигосахаридов [41]. Такая возможность является важной, т. к. лактулоза и галактоолигосахариды могут оказывать синергетический эффект с точки зрения пребиотического индекса [1].

Анализ таблицы 1 показывает, что максимальные выходы лактулозы были получены при разных значениях pH, не всегда совпадающих с оптимальными для данного вида ферментов: в диапазоне 6,0–7,5 с β -галактозидазами *K. lactis* (оптимум 7,0) и 3,5–6,6 с ферментами *A. oryzae* (оптимум 4,5) [55]. Температуры проведения реакции также варьировались в широком диапазоне: 37–60 °С с β -галактозидазами *K. lactis* (оптимум 50 °С) и 30–50 °С с ферментами *A. oryzae* (оптимум 65 °С) [55]. Отдельные исследования проведены при 6 °С с целью повышения микробиологической чистоты получаемых продуктов. Был получен неожиданно высокий выход лактулозы (до 27 %) [57, 58].

Концентрация фермента также влияет на селективность реакции биоконверсии лактозы. При высокой концентрации фермента (более 15 ЕД/мл) как первичный (гидролиз лактозы), так и вторичный гидролиз (деградация лактулозы) проходили быстрее [61]. Как кинетически контролируемая реакция вторичный гидролиз протекает после достижения максимальной концентрации лактулозы. Это явление хорошо изучено при периодической работе с использованием свободного (нативного) или иммобилизованного фермента [41, 44, 49, 52].

Один из путей решения проблемы гидролиза лактулозы – непрерывное проведение процесса. Например, в ферментативном мембранном реакторе (FMR), микроканальном реакторе или реакторе с уплотненным слоем [25, 47, 52–54, 61]. Применение системы FMR позволило непрерывно удалять образованную лактулозу, ограничивая ее расщепление. Удельная продуктивность оставалась постоянной (0,7 мг лактулозы на ед. фермента в ч) [52]. Однако активность фермента в FMR может снижаться из-за электростатического взаимодействия между ферментом и поверхностью мембраны, а также из-за механической и термической инактивации. Концентрация лактулозы уменьшилась на 31 % в течение 7 дней работы с использованием β -галактозидазы *K. lactis* [54].

Для преодоления этого нежелательного эффекта был разработан автоматизированный контроль внесения ферментов в систему FMR. Добавляя новые порции β -галактозидазы *A. oryzae* (10 % от исходного количества каждые 48 ч), концентрацию лактулозы на выходе поддерживали постоянной на уровне 8,8 г/л (выход 5,5 %) в течение 28 дней [61]. Концентрация лактулозы увеличилась в 3,3 раза при работе реактора с уплотненным слоем в непрерывном режиме, по сравнению с многократным периодическим режимом работы, хотя в последнем катализатор можно было использовать повторно 10 раз [48].

Особый интерес представляют работы, в которых проведено сравнение разных ферментов. Одиннадцать разных коммерческих β -галактозидаз различного происхождения, в т. ч. 4 дрожжевых и 6 плесневых, были исследованы для определения их каталитического потенциала в отношении гидролиза и трансгалактозилирования, а также их сродства в отношении доноров и акцепторов галактозы [55]. Все испытанные β -галактозидазы были способны использовать лактозу и лактулозу в качестве акцепторов и доноров галактозы. Однако дрожжевые лактазы показали более высокую гидролитическую активность, чем трансгалактозилирующую. Причем для лактозы она выше, чем для лактулозы. При концентрациях углеводов в растворе более 10 % трансгалактозилирование преобладало над гидролизом, а при концентрациях более 40 % гидролиз лактозы и лактулозы был незначительным.

Максимальные выходы лактулозы при использовании β -галактозидаз *A. oryzae* были на 5 % выше, чем с β -галактозидазами *A. niger* и *Aspergillus aculeatus*, и на 1–6 % выше, чем с β -галактозидазами *K. lactis* разных производителей. Концентрация и состав полученных галактоолигосахаридов зависели от вида фермента. В опытах с ферментами *A. oryzae* были получены три- и тетрасахариды, а с *A. niger* и *K. lactis* – ди- и трисахариды. Полученные данные подтвердили, что происхождение фермента определяет его потенциал трансгалактозилирования и способность использовать различные молекулы в качестве акцепторов фрагмента галактозы. Кроме того, источник фермента определяет молекулярную структуру трансгалактозилированных олигосахаридов: состав продуктов, количество гексозных звеньев и типы связей между ними [55].

В результате тестирования семи различных β -галактозидаз на их способность продуцировать лактулозу при 6 °С установлено, что три ферментных препарата из микромицет (*Biolactase*, *Lactozym* и *Enzeco*) позволили получить высокие выходы лактулозы (более 20 %) в течение 24 ч. *Enzeco* показал высокую активность в диапазоне pH от 4,5 до 6,5, в то время как *Lactozym* и *Biolactase* лучше использовать при pH 6,0 и 6,5. Проведение реакции синтеза при низких температурах обеспечивает микробиологическую чистоту получаемых продуктов и длинный интервал высокой концентрации лактулозы, что позволяет инактивировать ферменты даже в промышленном масштабе [57].

В ряде работ для биосинтеза лактулозы были использованы различные формы и виды иммобилизации β -галактозидазы: на силикагеле, в нанотрубках, на хитозане с глутаровым альдегидом, с агарозой и полиэтиленамином, с глутаровым альдегидом, с различными производными агарозы [23, 48, 49, 56, 59, 60, 62–65, 67, 71].

Три разных коммерческих β -галактозидазы из *K. lactis* были иммобилизованы на разных носителях. Показано, что иммобилизация влияет на свойства β -галактозидаз в кинетически контролируемом синтезе. Фермент, иммобилизованный на глиоксилагарозе, был неактивен в производстве лактулозы при 25, 37 и 50 °С. Иммобилизация на агарозе, покрытой полиэтиленамином, позволила получить лактулозу только при 50 °С, а на хитозане, активированном глутаральдегидом, – при всех трех температурах. Использование молочной сыворотки вместо чистой лактозы и фруктозы привело к повышению выхода при использовании агарозы и его снижению при использовании хитозана [23].

Иммобилизация фермента из *A. oryzae* в агарозе четвертичного аммония (QAA) позволила получить более высокие показатели (общий выход лактулозы и совокупную удельную продуктивность) при повторной периодической операции, чем со

свободным ферментом с момента первой загрузки. QAA-носитель повторно использовали без изменения его максимальной ферментативной емкости и без снижения производительности и селективности синтеза лактулозы, что уменьшило экономические затраты на процесс [67]. Эффективность использования биокатализаторов может быть увеличена также с помощью повторной периодической подпитки [68].

Для синтеза лактулозы использовали шитые агрегаты (CLEA) β -галактозидазы *A. oryzae*. Несмотря на то что было получено 17 % снижение выхода по отношению к свободному ферменту, катализатор можно было использовать повторно 100 раз. Поэтому накопленная масса продукта на единицу массы использованного катализатора увеличилась в 12 раз [60].

С точки зрения экономических показателей технологии лактулозы перспективным является применение не очищенных ферментов, а клеток микроорганизмов как источников биокатализаторов. Показана возможность синтеза лактулозы в растворах лактозы и фруктозы с использованием суспензии клеток *K. lactis* без обработки и пермеабелизованных этанолом [41]. Для этого выращенную на плотной питательной среде колонию *K. lactis* активизировали сначала в элективной жидкой питательной среде при 28 °С в течение 24 ч, а затем 1 % инокулята переносили в ферментационную среду и культивировали при тех же условиях. Полученный инокулят центрифугировали при 8000 g в течение 5 мин, отделенные клетки ресуспендировали в калий-фосфатном буфере (pH 7,0). Для получения пермеабелизованных клеток их ресуспендировали в 50 % (об./об.) этаноле, перемешивали в течение 15 мин при 4 °С, дважды промывали дистиллированной водой и ресуспендировали в калий-фосфатном буфере, содержащем лактозу и фруктозу для производства лактулозы. Реакцию останавливали кипячением. Максимальная концентрация лактулозы 14,8 г/л была получена при концентрации пермеабелизованных клеток 8 г/л, но продуктивность (1,64 г/л·ч) была ниже, чем при концентрации клеток 10,4 г/л (2,0 г/л·ч). Поэтому последняя была признана оптимальной. В экспериментах с необработанными клетками максимальная концентрация синтезированной лактулозы была сопоставима с результатами опытов с пермеабелизованными клетками (около 17 и 19 г/л соответственно), но для ее достижения требовалось больше времени (около 5 и 3 ч соответственно). Поэтому продуктивность в последнем случае была выше [41].

С целью снижения затрат на процесс производства лактулозы в некоторых работах предлагается использовать вторичное молочное сырье: сыворотку и УФ-пермеаты [23, 42, 47, 49, 56–59]. Оптимальные условия проведения процесса были определены в

условиях моделирования для кислой сыворотки (фермент *Enzeco* из *A. oryzae* с активностью 2,0 мккат/кг при pH 4,4; 1,28 моль/кг фруктозы и 0,17 моль/кг лактозы) и сладкой сыворотки (*Lactozum* из *K. lactis* с активностью 2,8 мккат/кг при pH 6,6; 0,74 моль/кг фруктозы и 0,19 моль/кг лактозы) через 48 ч при 6 °С [58].

Процесс получения β -галактозидазы *K. lactis* с использованием подсырной сыворотки и иммобилизацией на 2,0 % (масс./об.) хитозане, активированном глутаральдегидом, позволил получить высокоактивный и стабильный биокатализатор, способный одновременно гидролизовать лактозу (степень конверсии 42,8 %) и продуцировать лактулозу на уровне 17,3 г/л. Осветленную сыворотку использовали как для повышения β -галактозидазной активности дрожжей, так и для основного культивирования. Процессы осуществляли при 30 °С и перемешивании (180 об/мин) в течение 24 ч, клеточную массу отделяли центрифугированием, промывали и суспендировали в калий-фосфатном буфере с добавлением $MnCl_2$. Установлено, что ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} (до 5×10^{-3} мМ) активировали полученную β -галактозидазу, а Ca^{2+} (выше 1 мг/л) и Zn^{2+} (выше 0,011 мг/л) оказывали ингибирующее действие на этот фермент. Поскольку β -галактозидаза дрожжей является внутриклеточным ферментом, то для его экстракции использовали различные методы. Разрушение клеток с использованием стеклянных шариков путем встряхивания в течение 30 мин при 2000 об/мин оказалось на 87 % более эффективным, чем разрушение клеток дрожжей ультразвуковыми волнами в течение 40 мин при 25 °С [59].

Еще один аспект, который нужно учитывать, – это возможность образования разных конформаций лактулозы. Во время ферментативной реакции посредством трансгалактозилирования, помимо $\beta 1 \rightarrow 4$, могут образовываться связи $\beta 1 \rightarrow 1$, $\beta 1 \rightarrow 3$, $\beta 1 \rightarrow 5$ и $\beta 1 \rightarrow 6$ [39]. Во время ферментативного синтеза лактулозы образуются два основных изомера: лактулоза $\beta 1 \rightarrow 4$, которая получается во время химической изомеризации лактозы в лактулозу, и лактулоза $\beta 1 \rightarrow 1$, называемая 1-лактuloзой или аллолактuloзой, которая обнаруживается исключительно при ферментативном трансгалактозилировании. 1-лактuloза является основным продуктом этой реакции, причем все дрожжевые β -галактозидазы образуют $> 0,75$ этого изомера, а плесневые β -галактозидазы около 0,6. Изучение структуры было выполнено для определенной β -галактозидазы *K. lactis* методом ВЭЖХ [46]. С помощью ЯМР-анализа установлено, что дополнительный пик, генерируемый аналогичными реакциями, соответствует 1-лактuloзе [52].

Максимальные выходы лактулозы при биосинтезе с использованием β -галактозидаз микро-

мицет (около 20–30 %) сопоставимы с результатами щелочной изомеризации (около 30 %), но ниже, чем при химическом синтезе с комплексобразующими боратами (около 70 %). В большинстве проанализированных работ для получения лактулозы применяют дорогостоящие высокоочищенные коммерческие препараты β -галактозидаз, что удорожает процесс производства. Одно из решений этой проблемы – получение неочищенных ферментных препаратов в рамках технологического процесса получения лактулозы. В качестве источника β -галактозидаз можно использовать любые культуры непатогенных лактозосбраживающих дрожжей, причем не только *K. lactis*, но и *Kluyveromyces marxianus*. Последний вид рассматривается как перспективный объект получения ферментов для пищевой промышленности и биотехнологии, т. к. некоторые штаммы могут вырабатывать не только эндо-, но и экзоферменты [72]. Дрожжи-продуценты лактаз хорошо изучены российскими учеными и продолжают оставаться в центре их внимания [73]. Анализ литературы показал, что в качестве перспективных штаммов можно рассматривать *K. marxianus* ВКМ Y-453, ВКМ Y-459, ВКМ Y-460, ВКМ Y-1338, ВКМ Y-1341 и ВКМ Y-1342. Высокая β -галактозидазная активность была подтверждена разными группами ученых [74]. В качестве продуцентов β -галактозидаз могут быть использованы также молочнокислые микроорганизмы, многие из которых давно и широко применяют как стартерные (заквасочные) культуры. Интересным направлением является совместное культивирование дрожжей и молочнокислых микроорганизмов для получения комплексных ферментных препаратов β -галактозидаз [75].

Еще одна важная тенденция, которая прослеживается в публикациях последних лет, – использование доступного и недорогого вторичного молочного сырья. Целесообразно применять подсырную и творожную сыворотку для процессов культивирования продуцентов при получении β -галактозидаз, а для синтеза лактулозы – ультрафильтраты обезжиренного молока и сыворотки. Следует учитывать оптимальный для ферментов уровень pH: при использовании сладкой сыворотки лучше использовать β -галактозидазы из *K. lactis*, а кислой сыворотки – из *A. oryzae*.

Для получения лактулозы с использованием β -галактозидаз необходимо добавление фруктозы. Это является «узким местом» данного способа, т. к. – фруктоза вносится в больших концентрациях (в сопоставимых или более высоких в сравнении с лактозой), что удорожает технологию; – значительная часть (до 90 %) фруктозы не участвует в синтезе и остается в растворе; она имеет высокую растворимость и трудно удаляема из реакционной смеси.

Для решения этой проблемы необходимо искать условия реакций с минимальным возможным добавлением фруктозы и максимальным выходом лактулозы. Еще один путь – биотрансформация образующейся при гидролизе лактозы глюкозы во фруктозу – будет рассмотрен в разделе 4.

3. Применение гликозидаз бактерий. Способностью вырабатывать β -галактозидазы обладают не только микромицеты, но и многие бактерии. Это представители родов *Bacillus* (*Bacillus acidocaldarius*, *B. circulans*, *Bacillus coagulans*, *B. subtilis*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus stearothermophilus*), *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus sporogenes*, *Lactobacillus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii*), *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium infantis*), а также некоторые виды родов *Arthrobacter*, *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propioionibacterium*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Streptococcus*, *Sulfolobus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Trichoderma*, *Vibrio* и *Xanthomonas* [17, 76].

β -галактозидазы бактериального происхождения представляют собой белки внутриклеточной локализации, которые различаются молекулярной массой, количеством субъединиц, аффинностью к различным субстратам, рН оптимумом действия и термостабильностью. В литературных источниках наиболее полно охарактеризована β -галактозидаза *E. coli*. Она является моделью для понимания каталитического механизма действия фермента, но из-за возможной токсичности в пищевой промышленности не применяется. Как и дрожжевые, бактериальные β -галактозидазы проявляют максимум активности в диапазоне рН 6,5–7,5 [55].

Некоторым бактериальным β -галактозидазам свойственны высокий температурный оптимум действия и термостабильность. Лишь в некоторых публикациях представлены данные о β -галактозидазах мезо- и психрофильных бактерий, проявляющих активность при низких температурах. Например, имеются сведения о каталитической активности ферментов мезофильных бактерий *Xanthomonas* sp. и *B. subtilis* при 10 °С. Авторы предполагают, что высокая каталитическая активность фермента (39,7 % от максимума), выявляемого при 40 °С, является следствием продукции *Bacillus* sp. не менее двух молекулярных форм ферментного белка. β -галактозидаза *Pseudoalteromonas haloplanktis* ТАЕ 79b характеризуется оптимумом действия при 26 °С и проявляет не менее 33 % активности при 4 °С, а фермент *Pseudoalteromonas* sp. – 20 % от максимума, обнаруживаемого при 40 °С [45].

Хотя β -галактозидазы могут продуцироваться большим числом бактерий, в промышленном про-

изводстве для получения ферментных препаратов применяют *B. circulans*, а потенциальными их источниками считаются *Streptococcus thermophilus* и *B. stearothermophilus* [21, 76].

Способ получения бактериальной гликозидазы аналогичен описанным ранее методам выделения β -галактозидазы микромицет и включает культивирование чистой культуры в элективных средах при оптимальных условиях, выделение, очистку фермента и получение ферментного препарата. Основной трудностью при производстве ферментов, ассоциированных с клеточной стенкой, является проблема их экстракции без потери активности. Наиболее часто в качестве способов для разрушения бактериальных клеток, позволяющих получить достаточно высокий выход и активность β -галактозидазы, применяют ультразвуковое воздействие и обработку на высокоскоростных бисерных мельницах и гомогенизаторах высокого давления. Для очистки β -галактозидазы используют методы ультрафильтрации и гельпроницающей, ионообменной, аффинной хроматографии [77, 78].

Первая работа по биосинтезу лактулозы с β -галактозидазой кишечной палочки была опубликована в 1987 г., с β -гликозидазой термофильных архей *Pyrococcus furiosus* – в 2004 г. [24, 79]. Позже появились данные о применении коммерческих β -галактозидаз *B. circulans* и некоторых других видов бактерий. Условия процессов, при которых были получены максимальные выходы лактулозы, представлены в таблице 2.

Гликозидазы, представленные в таблице 2, можно разделить на две группы: термостабильные с температурным оптимумом 50–85 °С и мезофильные с максимальной активностью при 37–40 °С. Наибольшее распространение для биосинтеза лактулозы получили ферменты первой группы. Объясняется это тем, что применение в промышленном производстве термостабильных гликозидаз имеет ряд преимуществ и позволяет обеспечить хорошую растворимость субстрата, высокий выход итогового продукта и скорость реакции, низкое ингибирование продукта, а также снижение риска контаминации. Для получения таких ферментов могут быть использованы методы генной инженерии [24, 25, 83]. Применение термостабильной гликозид-гидролазы *Caldivirga maquilingsis*, обладающей 100 % β -галактозидазной активностью (50 % гликозидазной и 25 % ксилозидазной), обеспечило высокую степень конверсии лактозы. Фермент продемонстрировал максимум своей активности при температуре 85 °С, причем с повышением температуры увеличивался выход лактулозы. Однако дальнейшее нагревание выше 90 °С приводило к снижению активности гликозид-гидролазы, связанному с ее инактивацией. Отмечено также, что полученная гликозид-гидролаза проявляла высокую степень активности при

Таблица 2. Биосинтез лактулозы с использованием бактериальных гликозидаз

Table 2. Biosynthesis of lactulose with bacterial glycosidases

Продуцент	Фермент (препарат, форма применения)	Субстрат, % вес/объем	Условия процесса	$Y_{\text{лп}}^*$ %*	Источник
β-галактозидазы					
<i>Escherichia coli</i>	Иммобилизованный на Eupergit	Раствор галактозы 10 % и фруктозы 50 %	pH = 6,8, 37 °C Период.**	6,3	[79]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 40 % и фруктозы 20 %	pH = 6,0, 80 °C Период.	12,5	[80]
<i>Bacillus circulans</i>	Lactoles L3 Свободный	Раствор лактозы 32,8 % и фруктозы 17,4 %	pH = 5,5, 45 °C Период.	1,5	[45]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Свободный	Раствор лактозы 40 % и фруктозы 20 %	pH = 7,0, 40 °C Период.	6,25	[81]
<i>Bacillus circulans</i>	Biocon NTL 3000 Свободный	Раствор лактозы 13,3 % и фруктозы 26,6 %	pH = 6,0, 60 °C Период.	9	[55]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Иммобилизованный на поверхности спор <i>Bacillus subtilis</i>	Раствор лактозы 20 % и фруктозы 10 %	pH = 6,0, 75 °C Период.	4,4	[82]
β-глюкозидазы					
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 3,42 % и фруктозы 27 %	pH = 5,0, 75 °C Период.	44	[24]
	Иммобилизованный на Eupergit C			45	
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 3,4 % и фруктозы 27 %	pH = 5,0, 75 °C Непер.**	41	[25]
	Иммобилизованный на Eupergit C			43	
	Иммобилизованный на Amberlite IRA-93			43	
				43	
Гликозид-гидролаза					
<i>Caldivirga maquilingensis</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 14 % и фруктозы 56 %	pH = 4,5, 85 °C Период.	77	[83]

* выход лактулозы, % от исходной лактозы, расчетное значение по данным публикации;

** Период – периодический способ, Неper. – непрерывный способ ферментации.

* lactulose yield, % of initial lactulose, calculated value is based on published data;

** Periodic – periodic method, Continuous – continuous fermentation.

pH = 4–5. Проведение синтеза в слабокислой среде позволяет снизить вероятность протекания реакции Майяра [83].

Геномная ДНК *Sulfolobus solfataricus*, кодирующая синтез β -галактозидазы, была клонирована и встроена в клетки штамма *E. coli* ER2566. Полученная таким образом β -галактозидаза имела широкий диапазон оптимума pH от 5,0 до 7,0, сохраняя более 90 % своей начальной активности. Фермент проявлял кинетику термической инактивации первого порядка, периоды полураспада ($t_{1/2}$) при 75, 80, 85, 90 и 95 °C составляли 91, 48, 35, 2,6 и 0,72 ч соответственно. Максимальная активность β -галактозидазы была зарегистрирована при температуре 80 °C. При температурах до 80 °C реакция трансгалактозилирования шла быстрее, а выход лактулозы увеличивался. Температуры выше

80 °C приводили к уменьшению количества лактулозы, что связано со снижением стабильности β -галактозидазы. Установлено, что добавление катионов Fe^{2+} способствовало увеличению количества лактулозы на 10 %, а внесение Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} и Co^{2+} на ее выход не повлияло. Влияние на биосинтез лактулозы оказали состав субстрата и количество фермента. Выход лактулозы возрастал с увеличением концентрации субстрата. Требовалось повышение активности вносимого фермента [80]. Однако добиться высокого выхода лактулозы с помощью данной β -галактозидазы не удалось.

Многие молочнокислые микроорганизмы (*L. acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* и *S. thermophilus*) обладают способностью продуци-

ровать β -галактозидазу [17]. Однако данных по использованию таких ферментов для биоконверсии лактозы в лактулозу мало. Трансгалактолизирующая активность β -галактозидазы *L. acidophilus* NRRL 4495 была исследована для синтеза лактулозы и олигосахаридов в различных условиях. Значительное влияние на выход пребиотика оказали продолжительность реакции, концентрация фермента и состав субстрата. Максимальное количество лактулозы было получено через 7 ч (6,89 г/л), а в промежутке времени 17–24 ч неуклонно снижалось. Содержание других олигосахаридов через 7 и 10 ч составило 17,2 и 19,68 г/л соответственно, что превышало количество полученной лактулозы. Еще одним фактором, повлиявшим на выход лактулозы, стала концентрация вносимого фермента. Повышение его содержания от 2 до 8 ЕД/мл способствовало увеличению количества лактулозы до 25 (в 3,6 раза больше контроля) и 15,4 г/л (в 2 раза больше контроля) через 7 и 10 ч соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации фермента до 10 ЕД/мл привело к снижению образования лактулозы. Отмечено, что проведение биоконверсии при pH 7,0 и содержании фермента 2, 4 и 6 ЕД/мл способствовало получению тетраолигосахаридов, при увеличении до 8 и 10 ЕД/мл синтезировались пентаолигосахариды, а при pH 5,5 и 8 ЕД/мл – трисахариды. Немаловажное значение имел состав субстрата. Наименьший выход лактулозы (5,05 г/л) был получен из реакционной смеси, содержащей 20 % галактозы, 20 % лактозы и 20 % фруктозы. Однако в этих условиях был получен высокий выход других олигосахаридов (17,25 г/л) [81].

Еще одним перспективным направлением ферментативного синтеза лактулозы с участием бактериальных β -галактозидаз является иммобилизация. Моносахарид D-галактоза, высвобождаемая из лактозы, представляет собой мощный ингибитор многих β -галактозидаз мезофильных микроорганизмов. Иммобилизация позволяет не только снизить это влияние, но и облегчает дальнейшее выделение фермента из реакционной смеси. Проведение сравнения гипертермостабильной β -гликозидазы *P. furiosus*, иммобилизованной на Eupergit C (CelB) и промышленной β -галактозидазы *A. oryzae* (Sigma-Aldrich), установило, что β -гликозидаза позволяет получить на 14 % лактулозы больше, чем β -галактозидаза. Для обоих ферментов повышение начальной концентрации лактозы в реакционной смеси приводило к росту абсолютного выхода продукта, но относительный выход снижался. Увеличение начальной концентрации лактозы способствовало образованию олигосахаридов, отличных от лактулозы. Добавление в среду фруктозы приводило к нарастанию относительного выхода лактулозы (до 48 %). Однако при содержании фруктозы 36 % наблюдался эффект ингибирования

реакции. Благодаря иммобилизации β -гликозидаза показала высокую стабильность и активность в ходе биосинтеза [24].

Непрерывный ферментативный процесс производства лактулозы посредством транс-галактозилрования был проведен с использованием свободной и иммобилизованной β -гликозидазы *P. furiosus*. Свободная β -гликозидаза (CelB) была получена гетерологически в клетках *E. coli* BL21. Далее фермент иммобилизовали на анионообменной смоле (Amberlite IRA-93) или на Eupergit C. Влияние на эффективность иммобилизации оказали уровень pH (оптимальный 7,5) и температура (30 °C). Активность β -гликозидазы, иммобилизованной на Eupergit C (1500 нкат/г), была выше, чем на Amberlite IRA-93 (920 нкат/г). Несмотря на то что итоговый выход лактулозы во всех трех случаях был примерно одинаковым (41–43 %), применение иммобилизации позволило повысить стабильность и продолжительность жизни фермента [25].

Большинство бактериальных β -галактозидаз являются внутриклеточными ферментами. Тем не менее имеются данные о способности некоторых микроорганизмов выделять их в среду в результате автолиза клеток по окончании процесса культивирования. Исследованы 32 ферментирующих лактозу штамма *L. brevis* и 15 штаммов *L. plantarum*, полученных из кисломолочного кумыса, а также из других продуктов, таких как ферментированный силос и ферментированные колбасы. Установлено, что клетки *L. brevis* в конце процесса культивирования способны выделять в среду внутриклеточную β -галактозидазу. Высвобождение фермента начинается сразу после окончания размножения и связано с автолизом клеток и разрушением их стенок. Клетки *L. plantarum* не высвобождали β -галактозидазу, поскольку автолиз происходил по другому пути [84]. Следовательно, поиск микроорганизмов, способных выделять фермент в среду, представляет интерес и может упростить процесс получения лактулозы.

Преимуществом применения бактериальных ферментов является возможность проведения процессов в широком диапазоне температур – от 20 (*Arthrobacter*) до 75 °C (*Pyrococcus*), а также до 80 °C (*Sulfolobus*) [24, 25, 80, 85]. Однако использование большинства бактериальных β -галактозидаз дает низкий выход лактулозы. Исключением являются работы с гликозидазами *P. furiosus* (до 45 % лактулозы) и гликозид-гидролазами *C. maquilingsis* (до 77 %), в которых применялись методы генной инженерии, что усложняет и удорожает процесс синтеза. Исследование с β -галактозидазой *L. acidophilus* показало возможность использования безопасных заквасочных культур молочнокислых микроорганизмов. Однако этот вопрос требует дополнительных исследований. В некоторых работах по-

казана возможность использования для биосинтеза лактулозы β -галактозидаз *Arthrobacter* sp. [1, 85]. Однако количественная оценка ее выхода не проводилась. В ряде публикаций установлено, что β -галактозидаза *B. circulans* обеспечивает низкий выход лактулозы, но высокий выход галактоолигосахаридов, и может быть использована для их биосинтеза [45, 55].

Таким образом, к перспективным направлениям биосинтеза лактулозы с участием бактериальных гликозидаз можно отнести использование ферментов, сохраняющих свою стабильность при высоких (выше 75 °С) и низких температурах (ниже 20 °С), а также слабо-кислых условиях среды (рН = 4–5); применение β -галактозидаз безопасных молочнокислых микроорганизмов и бактерий, продуцирующих фермент в среду культивирования; использование доступных и недорогих методов иммобилизации ферментов, обеспечивающих сокращение затрат на их выделение из реакционной среды, повышение их стабильности и возможности повторного применения.

4. Комбинированное применение β -галактозидаз и глюкоизомераз. Недостатком использования гликозидаз для синтеза лактулозы является обязательное наличие в составе субстрата фруктозы. Только часть фруктозы участвует в реакции биоконверсии, выступая в качестве акцептора галактозила. Ее остатки должны быть удалены из смеси после окончания реакции, что усложняет и удорожает процесс получения лактулозы. Для решения этой проблемы предлагается проводить

изомеризацию глюкозы, образовавшейся при гидролизе лактозы во фруктозу. С этой целью могут быть использованы глюкозоизомеразы (ЕС 5.3.1.18), которые производят в промышленных масштабах из различных продуцентов и используют для получения фруктозы. Данные об условиях процессов, при которых были получены максимальные концентрации лактулозы, представлены в таблице 3.

Лактулоза была успешно синтезирована двойным ферментативным методом в водно-органических двухфазных средах с использованием в качестве сырья лактозы и фруктозы. Иммобилизацию β -галактозидазы проводили путем ее сшивания с магнитными микросферами, состоящими из Fe_3O_4 и хитозана, с размером 5–10 мкм. В качестве водной фазы использовали фосфатный буфер. Экспериментальные результаты показали, что органо-водные среды могут повышать трансгликозилирующую активность лактазы и выход лактулозы. Установлено, что при увеличении содержания воды в системе как выход лактулозы, так и скорость превращения лактозы постепенно снижаются. Однако в отсутствие воды лактулоза практически не образовывалась. На начальной стадии реакции концентрация фруктозы была небольшой из-за низкого содержания глюкозы, поэтому в реакционную смесь была дополнительно внесена фруктоза. Выход лактулозы достигал максимального значения при 30 °С. При повышении температуры до 35 °С наблюдалось его снижение в два раза. Выход лактулозы поддерживался на максимальном уровне в диапазоне рН от 6,0 до 9,0 в период от

Таблица 3. Биосинтез лактулозы с использованием β -галактозидаз и глюкоизомераз

Table 3. Biosynthesis of lactulose based on β -galactosidases and glucoisomerases

Продуцент	Ферменты (вид, препарат, форма применения)	Субстрат, % вес/объем	Условия процесса	$Y_{\text{лп}}$, %*	Источник
<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Streptomyces murinus</i>	β -галактозидаза Иммобилизованный Глюкоизомераза Иммобилизованный (производство Novozyme)	Циклогексан: буферная система 95:5 об./об., лактозы 80 % и фруктозы 10 %	рН = 8, 30 °С, 2 ч Период.**	18,9	[44]
<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Streptomyces rubiginosus</i>	β -галактозидаза Lactozym Свободный Глюкоизомераза Gensweet Свободный	Стушенный УФ-пермеат обезжиренного молока, лактозы 40 %	рН = 7,8, 45 °С Период.	1,1	[86]
<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Streptomyces rubiginosus</i>	β -галактозидаза Иммобилизованный Глюкоизомераза Иммобилизованный	Раствор лактозы 20 %	рН = 7,5, 53,5 °С Период.	3,8	[87]

* выход лактулозы, % от исходной лактозы, расчетное значение по данным публикации;

** Период. – периодический способ, Непер. – непрерывный способ ферментации.

* lactulose yield, % of initial lactulose, calculated value is based on published data;

** Periodic – periodic method, Continuous – continuous fermentation.

2 до 4 ч. Степень превращения лактозы оставалась на уровне 65 % [44]. Основными недостатками вышеописанного способа получения лактулозы являются использование высоких концентраций органических растворителей, которые необходимо удалять, и сложность оформления процесса иммобилизации ферментов.

В исследовании Y.-S. Song и др. в качестве источника лактозы использовалась сыворотка [87]. Фруктоза была получена с помощью изомеризации глюкозы и дополнительно в субстрат не вносилась. Иммобилизация ферментов проводилась путем добавления активированных силикагелей к предварительно обработанному раствору β -галактозидазы или глюкозоизомеразы, которые подвергали реакции при 20 °С в течение 12 ч при постоянном перемешивании [87].

Влияние концентрации лактозы на синтез лактулозы оценивали с использованием различных концентраций лактозы в реакционной смеси (масса/объем). Выход лактулозы увеличивался с повышением концентрации лактозы с 14 до 20 %. При более высокой концентрации резко повышалась вязкость реакционной смеси, что приводило к ингибированию ферментов. Концентрация фруктозы увеличивалась по мере повышения доли иммобилизованной глюкозоизомеразы: максимальная концентрация 33,9 г/л была достигнута при соотношении иммобилизованной β -галактозидазы и глюкозоизомеразы 1:6 через 2 ч реакции. Выход лактулозы увеличивался пропорционально концентрации фруктозы до соотношения ферментов 1:5, что может быть связано с ограничением массопереноса, вызванным повышением вязкости реакционной смеси по мере роста количества иммобилизованного фермента [87]. К недостаткам описанного способа относится применение дорогих очищенных ферментных препаратов, трудоемкость их иммобилизации и низкий выход лактулозы.

Биферментная система была использована для обработки сгущенного УФ-пермеата обезжиренного молока, в который вносили 0,5 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и проводили инкубацию с β -галактозидазой и глюкозоизомеразой при pH 7,8 и температуре 45 °С. Скорость образования транс олигосахаридов была более высокой в течение первого часа ферментации, когда было получено 16,4 % галактоолигосахаридов и 0,7 % лактулозы, а затем снижалась: через 4 часа выход составил 21,4 и 1,1 % соответственно [86].

Таким образом, совместное применение β -галактозидаз и глюкоизомераз позволяет полностью или частично решить проблему внесения фруктозы в субстрат для синтеза лактулозы, но усложняет процесс ее получения и не приводит к увеличению выхода лактулозы. Для таких способов нужны дополнительные ферменты (глюкоизомеразы), а также возникают проблемы с очищенными ферментными

препаратами (стоимость, санкции и т. п.). Учитывая информацию о том, что глюкоизомеразы могут продуцироваться некоторыми видами дрожжей, в частности хлебопекарными (*Saccharomyces cerevisiae*), представляет интерес их добавление в систему получения неочищенных β -галактозидаз или использование природного симбиоза кефирных грибов, который содержит несколько видов молочнокислых бактерий и дрожжей.

5. Применение бактериальных целлобиозо-эпимераз для получения лактулозы. В основе превращения лактозы в лактулозу под действием целлобиозо-эпимеразы лежит реакция изомеризации, где глюкозный фрагмент лактозы изомеризуется во фруктозу [26]. Точный механизм трансформации лактозы в лактулозу при использовании эпимераз пока не выяснен.

Все известные целлобиозо-эпимеразы имеют оптимальный pH около нейтрального, оптимальная температура зависит от организма-источника фермента и колеблется в пределах от 8 до 85 °С [26]. В литературных источниках имеются сведения о том, что использование низких температур в процессе биосинтеза лактулозы ведет к образованию эпилактозы как основного продукта реакции [33]. Эпилактоза оказывает положительный биологический эффект на здоровье человека, способствует развитию бифидобактерий и лактобацилл и улучшает всасывание кальция и магния [26]. Ряд исследований посвящен получению эпилактозы в качестве основного продукта конверсии лактозы [33, 37, 88]. Однако если целью работы является увеличение выхода лактулозы, то присутствие эпилактозы в качестве итогового продукта биосинтеза считается нежелательным. Данные об условиях процессов, при которых были получены максимальные концентрации лактулозы, представлены в таблице 4.

Анализ таблицы 4 позволяет сделать вывод о том, что наиболее часто для синтеза лактулозы используют целлобиозо-2-эпимеразу бактерии *C. saccharolyticus*. Выход лактулозы колеблется в пределах от 43 до 88 %. Наибольшее значение позволяет получить добавление в реакционную смесь борной кислоты [36]. Это обусловлено образованием лактулозо-боратных комплексов. Средство связывания бората с лактулозой в 59 раз выше, чем с лактозой. Борат, связывая вновь образованную лактулозу, способствует ее удалению из реакционной смеси и процесс синтеза продолжается. Отмечено, что чем больше молярные соотношения бората и лактозы, тем выше степень изомеризации лактозы. Однако при соотношении 1:1 М наступает плато, а степень изомеризации лактозы достигает своего максимума. Образование эпилактозы в качестве побочного продукта реакции через 1 ч составляло около 10 %, через 3 ч снизилось и не превышало 2 %. Данный метод позволяет получить высокий выход лактулозы,

Таблица 4. Биосинтез лактулозы с использованием целлобиозо-2-эпимераз

Table 4. Biosynthesis of lactulose using cellobiose-2-epimerases

Продуцент	Фермент (препарат, форма применения)	Субстрат, % вес/объем	Условия процесса	$Y_{\text{лкт}}$, %*	Источник
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 70 %	pH = 7,5, 80 °С, 2 ч Период.**	58	[89]
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 34,2 %	pH = 7,0, 70 °С, 3 ч Период.	54,3	[35]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 70 % + бората 12 % Раствор лактозы 70 %	pH = 7,5, 80 °С, 3 ч Период.	88 58	[36]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Имобилизованный на спорах <i>Bacillus subtilis</i>	Раствор лактозы 70 %	pH = 7,0, 80 °С, 4 ч Период.	56,4	[34]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Ультрапастеризованное молоко: 1,5 % жира, 4,85 % лактозы	pH = 7,5, 50 °С, 24 ч Период. pH = 7,5, 80 °С, 72 ч Период.	57,7 56,7	[37]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Мутантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 50 %	pH = 7,5, 80 °С, 4 ч Период.	76	[30]
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 51 %	pH = 8,4, 25 °С Период.	< 3	[28]
<i>Dyadobacter fermentans</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 51 %	pH = 7,7, 40 °С Период.	6–9	[28]
<i>Ruminococcus albus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 51 %	pH = 7,5, 20 °С Период.	6–9	[28]
<i>Rhodothermus marinus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 51 %	pH = 6,3, 70 °С Период.	19	[28]
<i>Bacteroides fragilis</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 51 %	pH = 7,5, 35 °С Период.	< 3	[28]
<i>Butyrivibrio</i> sp. AE2015	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 51 %	pH = 7,0, 50 °С Период.	6–9	[28]
<i>Firmicutes bacterium</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 51 %	pH = 7,5, 35 °С Период.	< 3	[28]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Bacillus subtilis</i> WB800 Свободный	Подсырная сыворотка (лактозы 20 %)	pH = 7,0, 80 °С Непрер.**	58,5	[90]
<i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 20 %	pH = 7,5, 70 °С, 4 ч	55	[32]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Мутантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 20 %	pH = 7,5, 65 °С, 2 ч Период.	43	[29]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Имобилизованный в виде сшитых агрегатов (CLEAs)	Раствор лактозы 25 %	pH = 7,5, 80 °С Непрер.	58,8– 61,7	[91]
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	Рекомбинантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 20 % Раствор лактозы 40 %	pH = 7,0, 80 °С Период.	50,7 46,7	[92]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Мутантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 27,4 %	pH = 7,5, 70 °С Период.	75	[31]
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Мутантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 27,4 %	pH = 7,5, 70 °С Период.	69	[31]
<i>Rhodothermus marinus</i>	Мутантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 27,4 %	pH = 7,5, 70 °С Период.	82	[31]
<i>Ruminococcus albus</i>	Мутантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 27,4 %	pH = 7,5, 70 °С Период.	69	[31]
<i>Spirochaeta thermophila</i>	Мутантный в клетках <i>Escherichia coli</i> Свободный	Раствор лактозы 27,4 %	pH = 7,5, 70 °С Период.	56	[31]

* выход лактулозы, % от исходной лактозы, расчетное значение по данным публикации; ** Период – периодический способ, Непрер. – непрерывный способ ферментации.

* lactulose yield, % of initial lactulose, calculated value is based on published data; ** Periodic – periodic method, Continuous – continuous fermentation.

а также является проще и экологичнее, чем щелочной синтез, но требует последующего удаления бората с помощью ионнообменных смол, что удорожает технологию.

Часто в работах, посвященных применению целлобиозо-эпимеразы в качестве катализатора для биоконверсии лактозы, встречается использование направленного либо случайного мутагенеза, целью которого является повышение термостабильности фермента [28, 31, 32, 35, 36, 89, 92]. Эта тенденция объясняется тем, что при промышленном синтезе лактулозы использование термостабильных ферментов имеет ряд преимуществ, в частности растворимость субстрата и скорость ферментативной реакции при высоких температурах увеличиваются. Рекombинантная целлобиозо-2-эпимераза термофильного *C. obsidiansis* продемонстрировала высокую термостабильность до 86,7 °С. Период ее полураспада составлял 8,1, 2,8 и 0,6 ч при 75, 80 и 85 °С соответственно. При использовании в качестве субстрата лактозы за короткий период образовывалась эпилактоза. Наибольший выход эпилактозы (55 г) был достигнут уже через 10 мин реакции, при этом образовалось только 10 г лактулозы. Это свидетельствует о том, что начальная скорость эпимеризации была выше, чем скорость изомеризации. Через 10 мин выход эпилактозы медленно снижался, а лактулоза стабильно вырабатывалась на протяжении 4 ч [32].

Были сконструированы восемь мутантов, несущих ген целлобиозо-2-эпимеразы *C. saccharolyticus*, пять из которых показали пролонгированное время полужизни инактивации при 80 °С. Использование мутации позволило увеличить температуру максимальной активности фермента с 80 до 87,5 °С. Мутанты E161D/S180P/S351G и E161D/N365P сохраняли более 50 и 70 % своей активности соответственно даже при 95 °С. Кроме того, мутантные ферменты были более устойчивы к химической денатурации и демонстрировали более широкий диапазон pH [71]. Авторы указывают на перспективу применения указанных мутантов для биосинтеза лактулозы, но данные по ее выходу в статье не приводят.

Еще одним подтверждением того, что наибольший выход лактулозы обеспечивает использование в качестве катализаторов целлобиозо-эпимераз термофильных бактерий, можно считать работу Y. Xiao и др., в которой показана возможность получения целлобиозо-2-эпимеразы из клеток термофильного микроорганизма *Dictyoglomus thermophilum* [92]. Полученный фермент имел более высокую начальную скорость эпимеризации. В первые 10 мин реакции вырабатывалось большое количество эпилактозы, затем ее выход снижался, но синтез лактулозы продолжался, что через 4 ч позволило получить ее высокий выход. Следует отметить, что

увеличение количества лактозы в субстрате не приводило к повышению степени ее конверсии.

Кинетику первого порядка для термической инактивации и периоды полураспада (константы скорости инактивации) через 74, 34, 16 и 5 ч при 65, 70, 75 и 80 °С соответственно показал рекombинантный фермент *C. saccharolyticus*. В работе Y.-S. Kim и D.-K. Oh отмечено, что выход лактулозы и эпилактозы увеличивался с повышением концентрации фермента до тех пор, пока не достигалось плато при 150 ЕД/мл целлобиозо-2-эпимеразы [89]. Увеличение концентрации лактозы в субстрате приводило к пропорциональному увеличению образования лактулозы и эпилактозы. Это отличает целлобиозо-эпимеразу от β -галактозидазы, трансгалактозилирующая активность которой возрастает с увеличением концентрации субстратов. Целлобиозо-2-эпимераза может продуцировать лактулозу даже при низких концентрациях лактозы в реакционной смеси, что позволяет использовать в качестве субстрата молочные продукты с низким содержанием лактозы [89].

Например, в качестве субстрата для биосинтеза лактулозы использовали ультрапастеризованное молоко. С целью сохранения микробиологической чистоты исследования образования лактулозы проводили при 8 и 50 °С. При этих температурах нежелательные органолептические изменения вкуса должны быть более или менее незначительными. Было проведено 2 биоконверсии с различной исходной активностью целлобиозо-2-эпимеразы *C. saccharolyticus*: $4,16 \pm 0,21$ и $39,5 \pm 1,4$ мккат_{эпилактозы, 50 °С}. В обоих случаях первым и быстро образующимся продуктом превращения лактозы была эпилактоза, максимальная концентрация которой была достигнута примерно через 40 и 5 мин соответственно. Далее ее концентрация неуклонно снижалась до тех пор, пока примерно через 6 ч не было достигнуто равновесие реакции. Отмечено, что при использовании в 9,5 раз более высокой исходной активности фермента выход эпилактозы (% мас./мас.) по отношению к исходной лактозе молока снижался с 33,6 до 15,5 %. Лактулоза появлялась в смеси с задержкой. Проведение биоконверсии при 8 °С и начальной активности целлобиозо-2-эпимеразы $CsCE 27,8 \pm 1,3$ мккат_{эпилактоза, 8 °С} позволило сделать следующий вывод: в общих чертах процесс образования эпилактозы и лактулозы был таким же, как при 50 °С, но медленнее, чем ожидалось. Максимальное количество лактулозы было достигнуто через 72 ч, концентрация эпилактозы составила 13,6 %. Проведение синтеза при 8 °С позволило получить высокую остаточную активность целлобиозо-2-эпимеразы (72 %), что почти в 10 раз больше, чем после реакции при 50 °С. Полученные данные по применению целлобиозо-эпимеразы в молоке могут быть использованы

для производства молочных продуктов, обогащенных лактулозой, с пребиотическими свойствами *in situ* [37]. Однако использование генно-модифицированных микроорганизмов при производстве пищевых продуктов вызывает опасения и споры у производителей и потребителей.

Молочная сыворотка, содержащая > 65 % лактозы и > 11 % белка, была использована в качестве субстрата для биосинтеза лактулозы в EMR системе. Отличительной особенностью данного метода является использование *B. subtilis* в качестве клеток хозяина для экспрессии геномной ДНК целлобиозо-2-эпимеразы *C. saccharolyticus*. В отличие от *E. coli* бактерии *B. subtilis* в процессе роста и развития не вырабатывают токсины и являются безопасными для применения в пищевой промышленности и фармацевтике. Кроме того, в результате проведенной генной модификации *B. subtilis* продуцирует внеклеточную целлобиозо-эпимеразу, т. е. снижаются затраты и упрощается процесс получения фермента. Проведение непрерывного синтеза лактулозы в EMR системе позволяет снизить потери фермента и проводить его повторное использование, а также увеличивает выход лактулозы за счет ее постоянного удаления из реакционной смеси. В течение первых 0,5 ч скорость конверсии лактозы была высокой. Однако она снижалась, когда степень превращения сахара превышала 50 %, и достигала максимума через 2 ч. Короткое время реакции позволяет снизить потребление энергии и затраты, что имеет большое значение для промышленного производства [90].

Еще одной целью мутагенеза целлобиозо-эпимеразы является снижение ее эпимеризационной активности и количества эпилактозы при одновременном повышении изомеризационной активности и увеличении выхода лактулозы. Методом случайного мутагенеза был получен мутант G4-C5 целлобиозо-2-эпимеразы *C. saccharolyticus* DSM 8903, который, по сравнению с природным ферментом (WT), продемонстрировал 3-кратное увеличение активности для синтеза лактулозы без ущерба для термостабильности. Мутант G4-C5 сохранял более высокую активность при низких температурах и широкий диапазон рН-активности, чем природный фермент WT. Выход лактулозы и эпилактозы, катализируемый природным ферментом WT, через 4 ч составил примерно 57 и 16 % соответственно. Концентрация лактулозы, катализируемая мутантом G4-C5, быстро увеличивалась в промежутке от 0 до 90 мин, а затем постепенно повышалась до постоянного уровня примерно 76 %. При использовании мутанта G4-C5 эпилактоза не была обнаружена [30].

При проведении рациональной генетической модификации целлобиозо-2-эпимеразы *C. saccharolyticus*, используя наложение 3 известных моделей структуры данного фермента, было идентифицировано 2 остатка (Tyr114, Asn184), которые играют

важную роль в связывании эпилактозы. Далее была осуществлена модификация этих остатков с целью предотвращения эпимеризации лактозы до эпилактозы и проведено сравнение способности природной и полученной мутантной целлобиозо-2-эпимеразы Y114E синтезировать лактулозу. Фермент Y114E позволял получить на 42 % лактулозы больше и на 80 % эпилактозы меньше, чем природный фермент [29].

С целью повышения изомеризационной активности и термостабильности целлобиозо-2-эпимеразы *C. saccharolyticus* (CsCE) с помощью замены гибких петель были сконструированы четыре мутанта. Фермент CsCE был выбран в качестве белкового каркаса, а «нижняя» часть его гибких петель заменена соответствующими частями других четырех ферментов: BtCE (*Bacillus thermoamylovorans*), RmCE (*Rhodothermus marinus*), RaCE (*R. albus*) и StCE (*S. thermophila*). Установлено, что изомеризационная и эпимеризационная активность мутантов целлобиозо-эпимераз, за исключением RmC, была снижена. Изомеризационная активность RmC (8,50 ед/мг) увеличилась в 2,2 раза, по сравнению с CsCE (3,85 ед/мг), эпимеризационная активность RmC (43,73 ед/мг) была близка к CsCE (44,22 ед/мг). Максимальная температура активности CsCE составляла 75 °С, для остальных мутантов это значение снижалось до 70 °С. Все ферменты проявляли кинетику первого порядка для термической инактивации. Значение периода полураспада ($t_{1/2}$) мутантного StC (38,29 ч) было выше, чем CsCE (29,07 ч). Значения $t_{1/2}$ других мутантов RmC (19,22 ч), RaC (17,08 ч) и BtC (23,11 ч) были ниже, чем у CsCE. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что иногда улучшение каталитической активности фермента отрицательно влияет на его термостойкость. Все четыре мутанта демонстрировали сходные с CsCE процессы биоконверсии лактозы и позволили получить от 56 до 82 % лактулозы. Количество эпилактозы варьировалось в пределах от 7 до 1 % [31].

Перспективным направлением биосинтеза лактулозы является иммобилизация целлобиозо-эпимеразы, которая повышает экономическую эффективность технологии, упрощает процесс выделения фермента из реакционной смеси, увеличивает его стабильность и дает возможность повторного использования. Целлобиозо-2-эпимераза *C. saccharolyticus*, после индукции в клетках *E. coli* BL21, была иммобилизована на спорах *B. subtilis* WB600. Важным показателем при иммобилизации является прочность связывания фермента с носителем. Установлено, что количество целлобиозо-эпимеразы, адсорбированной на спорах, было чувствительным к значению рН, т. к. рН адсорбционной среды изменяет состояние ионизации фермента и поверхности спор. Самая

высокая способность связывания целлобиозо-2-эпимеразы с поверхностью спор наблюдалась при pH 4,0 и 4,5, температуре 4 °C и продолжительности иммобилизации 2 ч. Процесс иммобилизации способствовал поддержанию активности фермента в более широком диапазоне pH, повышению его термостойкости и увеличению стабильности в процессе биосинтеза лактулозы, позволяя сохранить до 70 % своей активности даже после 8-кратного применения. При биосинтезе лактулозы на начальной стадии реакции скорость конверсии под действием свободного фермента была выше, чем у иммобилизованного, из-за того, что гранулированная форма последнего приводила к его неоднородному распределению в смеси. Однако спустя 4 ч реакции выход лактулозы с участием иммобилизованной целлобиозо-эпимеразы был на 52 % выше, чем под действием свободного фермента [34].

Иммобилизация целлобиозо-2-эпимеразы *C. saccharolyticus* была выполнена с помощью сшитых ферментных агрегатов (CLEA). В качестве наиболее эффективных биокатализаторов были выбраны Fru-CLEA (CLEA с фруктозой – моносахаридной поддержкой) и Suc-CLEA (CLEA с сахарозой – дисахаридной поддержкой). CLEA не демонстрировали увеличения оптимальной рабочей температуры, но имели расширенный температурный диапазон (70–80 °C) и сохраняли более высокую активность при температурах 50–90 °C. Возможность проведения конверсии лактозы при более низких температурах имеет плюсы, поскольку позволяет снизить расходы на энергию и способствует лучшей сохранности итогового продукта. В целом процесс биосинтеза лактулозы с использованием свободной целлобиозо-2-эпимеразы и CLEA был схожим, а содержание эпилактозы составило 9,3–10,2 % [91].

Данные по применению целлобиозо-эпимераз мезофильных микроорганизмов для биоконверсии лактулозы встречаются редко, что связано с невысоким выходом пребиотика. Использование мезофильной целлобиозо-2-эпимеразы *Flavobacterium johnsoniae* (FjCE), *R. albus* (RaCE), *Dyadobacter fermentans* (DfCE), *Bacteroides fragilis* (BfCE), *R. marinus* (RmCE), *Firmicutes bacterium* CAG:534 и *Butyrivibrio* sp. AE2015 для синтеза лактулозы не позволило добиться ее высокого выхода. Более того, количество эпилактозы, полученной в процессе реакции, находилось на уровне 30 % и превышало выход лактулозы. Изомеризационная активность указанных целлобиозо-эпимераз колебалась в пределах от $8,7 \pm 0,1$ до 1300 ± 37 пкат/мг [28].

Анализ данных таблицы 4 и литературных источников показал, что синтез лактулозы с применением в качестве катализаторов целлобиозо-эпимераз позволяет получить высокий выход продукта (38–88 %), сопоставимый со щелочной и бо-

ратной изомеризацией, и может быть использован для промышленного производства пребиотика.

На итоговый выход лактулозы влияние оказывают продуцент целлобиозо-эпимеразы и количество и форма фермента. Стабильно высокое количество лактулозы обеспечивает нативная (без мутации) целлобиозо-2-эпимераза термофильных бактерий *C. saccharolyticus*, *D. turgidum* и *C. obsidiansis* (54–58 %) [30, 35, 36, 37, 89, 90]. Одним из способов увеличения активности целлобиозо-эпимераз и повышения их термостабильности и выхода лактулозы является использование направленной или случайной мутации. Применение мутантной целлобиозо-эпимеразы дает выход лактулозы на уровне 56–82 % [31, 71].

Плюсом применения для синтеза лактулозы целлобиозо-эпимераз является потребность в единственном субстрате – лактозы в реакционной среде. В большинстве случаев увеличение концентрации лактозы в субстрате приводит к пропорциональному увеличению образования лактулозы. Целлобиозо-эпимераза способна синтезировать лактулозу из субстрата с невысоким содержанием лактозы, для чего могут быть использованы молочные продукты, в том числе сыворотка.

К недостаткам целлобиозо-эпимераз можно отнести отсутствие их промышленного производства. Это может быть связано с происхождением целлобиозо-эпимераз, продуцентами которых являются пока недостаточно изученные в плане безопасности культуры родов *Arthrobacter*, *Dictyoglomus* и *Calidicellulosripter*. В связи с этим способы получения лактулозы с использованием этих ферментов предусматривают применение генной инженерии, в частности экспрессии генов, отвечающих за их выработку в клетки других микроорганизмов (*B. subtilis* и *E. coli*). Применение генно-модифицированных микроорганизмов вызывает много споров и опасений у потребителей и усложняет процесс биосинтеза лактулозы.

Таким образом, к перспективным направлениям биосинтеза лактулозы с участием целлобиозо-эпимераз можно отнести применение методов генной модификации и мутагенеза для получения фермента с заданными свойствами, в частности повышенной термостабильностью и изомеризационной активностью, и проведение иммобилизации с целью повышения стабильности и активности фермента, а также возможности его повторного применения и упрощения процесса выделения из реакционной смеси.

6. Очистка лактулозы. Для удаления балластных веществ из растворов лакто-лактатулозы могут быть использованы различные химические, физические, механические и биологические методы. Физико-химические методы выделения лактулозы

как отдельная стадия очистки подробно описаны в ранее опубликованных работах [9, 10]. Для деминерализации традиционно применяют электродиализ и ионообмен. Побочные темноокрашенные продукты меланоидинообразования и карамелизации обычно удаляют рафинацией, а лактозу – кристаллизацией [9]. При выборе процессов очистки принимают во внимание требования к продукту, объем производства и финансовые возможности предприятия. Например, для пищевых добавок с олигосахаридами-пребиотиками можно использовать относительно недорогие перспективные методы: каскадную нанофильтрацию с высокой пропускной способностью и/или адсорбцию на активированном угле, которая позволяет разделять моно-, ди- и олигосахариды за счет их разной гидрофобности и пространственной ориентации групп СН. При очистке фармпрепаратов необходимы дорогостоящие методы высокоселективной хроматографии. Особое внимание должно уделяться разработке комплексных, взаимосвязанных процессов конверсии сырья и очистки готовых продуктов, т. к. это позволяет организовать непрерывную работу и снизить себестоимость [16].

Примером реализации такого подхода является создание мембранного биореактора для одновременного синтеза и фракционирования олигосахаридов. Присутствие β -галактозидазы в растворе с 15 %-ной концентрацией лактозы привело к снижению проницаемости ультрафильтрационных ацетатцеллюлозных мембран по отношению к моносахарам, ди- и трисахаридам на 60, 20 и 75 % соответственно. Соотношение синтеза и гидролиза галактоолигосахаридов зависело от скорости поперечного потока и рабочего давления. Оптимизация процесса позволила увеличить выход галактоолигосахаридов на 60 % по сравнению с реакциями без использования мембранных процессов [93].

В последние десятилетия внимание ученых привлекают биологические методы очистки. Они основаны на том, что микроорганизмы ферментируют только определенные углеводы с разной скоростью. Подобранные культуры, можно использовать их для селективного удаления моно- и/или дисахаридов из растворов олигосахаридов. Наиболее часто с этой целью используют дрожжи *S. cerevisiae*, *K. marxianus* и *K. lactis*. Такие методы не требуют какой-либо предварительной обработки растворов и специального оборудования, но могут привести к увеличению расходов на дополнительные процессы ферментации и удаления использованных микроорганизмов и продуктов их метаболизма [16].

Процессы биоочистки хорошо изучены в области получения галактоолигосахаридов. Применяют методы удаления глюкозы отдельно или вместе с

галактозой дрожжей, не ферментирующих лактозу, а также удаление моно- и дисахаридов. Применение штаммов дрожжей *Kluyveromyces* с высокой скоростью метаболизма глюкозы, галактозы и лактозы позволяет получать галактоолигосахариды высокой чистоты (более 90 %) [94].

Подобные стратегии могут быть использованы в технологии лактулозы. Для очистки коммерческих сиропов лактулозы были использованы биологические и физико-химические методы. Селективный ферментативный гидролиз лактозы и эпилактозы был проведен с использованием четырех коммерческих препаратов β -галактозидазы. Установлено, что наименьшей активностью по отношению к лактулозе и наибольшей в отношении лактозы и эпилактозы обладали β -галактозидазы *B. bifidum* (Saphera® 2600 L) и *B. circulans* (Biolactas NTL*2). Полученные образцы с гидролизованной лактозой и эпилактозой обрабатывали активированным углем и водным раствором этанола с целью удаления всех моносахаридов. В результате был получен продукт с высокой степенью чистоты (> 94 % лактулозы) [95].

Для очистки смеси транс олигосахаридов, полученных путем ферментативного синтеза с β -галактозидазой *A. oryzae*, использовали дрожжи *S. cerevisiae* и *K. marxianus*. В результате был получен продукт без моносахаридов, содержащий 28 % лактулозы и 20 % олигосахаридов [96].

Коферментация является многообещающим трендом в биотехнологии лактулозы. Это относится не только к комбинированному использованию ферментов разных видов дрожжей, сбраживающих и не сбраживающих лактозу, но и к совместной ферментации дрожжей и молочнокислых микроорганизмов. Примером этого является коферментация для улучшения физико-химических и органолептических свойств козьего молока или получения комплексных ферментных препаратов β -галактозидаз [75, 97]. Интерес представляет возможность коиммобилизации ферментов в процессах получения лактулозы с применением двух и более ферментов (как на стадии конверсии лактозы, так и очистки). Преимущества этого способа рассмотрены на примере производства сиропа лактофруктозы из лактозы, в котором используют одновременную ферментацию совместно с иммобилизованными β -галактозидазами и глюкозо-(ксилозо)-изомеразами [98].

Выводы

Известны два основных пути ферментативного превращения лактозы в лактулозу: изомеризация (прямой) и трансгалактозилирование (с промежуточным гидролизом). Для первого применяют целлюлозо-2-эпимеразы, которые пока не имеют статуса безопасности, их не производят в про-

мышленных масштабах, а побочным продуктом реакции является эпилактоза. Точный механизм этой реакции неизвестен. Второй путь предполагает применение гликозидаз, способных не только расщепить лактозу до галактозы и глюкозы, но и присоединять галактозный остаток к фруктозе. С этой целью обычно применяют β -галактозидазы, которые имеют международный статус безопасности и доступны на рынке, с хорошо изученным механизмом действия. Динамика научных публикаций свидетельствует об актуальности работ с применением β -галактозидаз для биосинтеза лактулозы.

Способность β -галактозидазы принимать в активном центре нуклеофилы, отличные от воды, определяет возможность образования не только лактулозы, но и более сложных олигосахаридов, в т. ч. галактоолигосахаридов разного строения. Эта способность определяется третичной структурой фермента, а также концентрацией лактозы и фруктозы в субстрате. Возможность регулирования соотношения получаемых в результате реакции углеводов является важной, т. к. лактулоза и галактоолигосахариды являются пребиотиками и могут оказывать синергетический эффект. Однако, если нужно получить чистую лактулозу, то другие олигосахариды придется удалять (разделять), что будет удорожать процесс.

Основными продуцентами β -галактозидаз для получения лактулозы являются дрожжи *Kluyveromyces lactis* и плесени *Aspergillus oryzae*. Хотя концентрации лактулозы варьируются при использовании ферментов разных микромицет, в оптимальных условиях можно достичь 30 %-ного выхода лактулозы, что соответствует результатам щелочной изомеризации.

Прямой зависимости между максимальными выходами лактулозы и использованными молярными соотношениями фруктоза:лактоза (m_f/m_l) не выявлено. Область m_f/m_l до 5 можно рассматривать как наиболее перспективную с точки зрения себестоимости продукта. Внесение больших количеств фруктозы приводит к повышению стоимости затрат на сырье. Большая часть фруктозы не участвует в синтезе лактулозы и остается в растворе, что затрудняет процессы очистки. Для решения этой проблемы необходимо искать условия реакций с минимально возможным добавлением фруктозы и максимальным выходом лактулозы. Также можно использовать биотрансформацию образующейся при гидролизе лактозы глюкозы во фруктозу.

Применение целлобиозо-эпимераз позволяет достигать высоких выходов лактулозы (70–80 %), сопоставимых с результатами химического катализа в присутствии алюминатов и боратов. Однако активно используют методы генной инженерии и мутагенеза, в том числе для повышения безопасности

ферментов. Применение генно-модифицированных микроорганизмов вызывает много споров и опасений у потребителей и усложняет технологический процесс. К таким проблемам может привести предлагаемый в некоторых работах химический синтез лактозы как источника лактулозы. С практической точки зрения выгоднее получать лактозу из недорогого вторичного молочного сырья. Например, сыворотки.

К наиболее перспективным тенденциям развития биотехнологии лактулозы, которые позволяют организовать непрерывную работу и снизить себестоимость, можно отнести:

- использование вторичного молочного сырья для процессов культивирования продуцентов при получении ферментов и для синтеза лактулозы;
- проведение иммобилизации ферментов с целью повышения их стабильности, активности и возможности их многократного применения и упрощения процесса выделения из реакционной смеси;
- применение разных моделей реакторов, в т. ч. мембранных, для одновременного синтеза и фракционирования лактулозы и галактоолигосахаридов;
- разработку комплексных, взаимосвязанных процессов получения ферментов, конверсии лактозы в лактулозу и очистки готовых продуктов, включая коферментацию и коиммобилизацию.

Критерии авторства

С. А. Рябцева – идея и структура работы, поиск, перевод и анализ информации, написание статьи. А. Г. Храмов – анализ информации, существенная переработка научного и интеллектуального содержания статьи. М. А. Шпак, А. Д. Лодыгин, Г. С. Анисимов, С. Н. Сазанова и Ю. А. Табакова – поиск, перевод и анализ информации, написание статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

S.A. Ryabtseva developed the research idea, designed the study, collected publications, translated them, analyzed the data, and wrote the manuscript. A.G. Khramtsov analyzed the data and revised the article. M.A. Shpak, A.D. Lodygin, G.S. Anisimov, S.N. Sazanova, and Yu.A. Tabakova collected publications, translated them, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors reported no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Budkevich RO, Anisimov GS, Chuklo AO, Shpak MA. Physiological effects, mechanisms of action and application of lactulose. *Problems of Nutrition*. 2020;89(2):5–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10012>
2. Ait-Aissa A, Aider M. Lactulose: Production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications. Practical and critical review. *International Journal of Food science and Technology*. 2014;49(5):1245–1253. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12465>
3. Hiraishi K, Zhao F, Kurahara L-H, Li X, Yamashita T, Hashimoto T, *et al.* Lactulose modulates the structure of gut microbiota and alleviates colitis-associated tumorigenesis. *Nutrients*. 2022;14(3). <https://doi.org/10.3390/nu14030649>
4. Chen H-B, Su X-Y. Efficacy and safety of lactulose for the treatment of irritable bowel syndrome. *Medicine*. 2019;98(39). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000017295>
5. Kishor C, Ross RL, Blanchard H. Lactulose as a novel template for anticancer drug development targeting galectins. *Chemical Biology and Drug Design*. 2018;92(4):1801–1808. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13348>
6. Karakan T, Tuohy KM, Janssen-van Solingen G. Low-dose lactulose as a prebiotic for improved gut health and enhanced mineral absorption. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.672925>
7. Nooshkam M, Babazadeh A, Jooyandeh H. Lactulose: Properties, technofunctional food applications, and food grade delivery system. *Trends in Food Science and Technology*. 2018;80:23–34. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.028>
8. Vera C, Guerrero C, Illanes A. Trends in lactose-derived bioactives: Synthesis and purification. *Systems Microbiology and Biomanufacturing volume*. 2022;2:393–412. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00068-2>
9. Ryabtseva SA. Lactulose technology. Moscow: DeLi print; 2003. 232 p. (In Russ.). [Рябцева С. А. Технология лактулозы. М.: ДеЛи принт, 2003. 232 с.]
10. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Recent advances on prebiotic lactulose production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016;32(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2103-7>
11. Karim A, Aider M. Contribution to the process development for lactulose production through complete valorization of whey permeate by using electro-activation technology *versus* a chemical isomerization process. *ACS Omega*. 2020;5(44):28831–28843. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04178>
12. Silvério SC, Macedo EA, Teixeira JA, Rodrigues LR. Biocatalytic approaches using lactulose: End product compared with substrate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016;15(5):878–896. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12215>
13. Vera C, Illanes A. Lactose-derived nondigestible oligosaccharides and other high added-value products. In: Illanes A, Guerrero C, Vera C, Wilson L, Conejeros R, Scott F, editors. *Lactose-derived prebiotics. A process perspective*. Academic Press; 2016. pp. 87–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2>
14. Wang M, Wang L, Lyu X, Hua X, Goddard JM, Yang R. Lactulose production from lactose isomerization by chemocatalysts and enzymes: Current status and future perspectives. *Biotechnology Advances*. 2022;60. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108021>
15. Lactulose market – Global industry insights, trends, outlook and opportunity analysis, 2022–2028 [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/lactulose-market-590>
16. Kruschitz A, Nidetzky B. Downstream processing technologies in the biocatalytic production of oligosaccharides. *Biotechnology Advances*. 2020;43. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107568>
17. BRENDA [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://www.brenda-enzymes.org>
18. Martins GN, Ureta MM, Tymczyszyn EE, Castilho PC, Gomez-Zavaglia A. Technological aspects of the production of fructo and galacto-oligosaccharides. Enzymatic synthesis and hydrolysis. *Frontiers in Nutrition*. 2019;6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00078>
19. Ureta MM, Martins GN, Figueira O, Pire PF, Castilho PC, Gomez-Zavaglia A. Recent advances in β -galactosidase and fructosyltransferase immobilization technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;61(16):2659–2690. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1783639>
20. van den Dungen MW, Boer R, Wilms LC, Efimova Yu, Abbas HE. The safety of a *Kluyveromyces lactis* strain lineage for enzyme production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105027>
21. Žolnere K, Ciproviča I. The comparison of commercially available β -galactosidases for dairy industry: Review. *Research for Rural Development*. 2017;1:215–222. <https://doi.org/10.22616/rrd.23.2017.032>
22. de Albuquerque TL, de Sousa M, e Silva NCG, Girão Neto CAC, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R, *et al.* β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;191:881–898. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>

23. Girão Neto CAC, e Silva NCG, de Oliveira Costa T, de Albuquerque TL, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R, et al. The β -galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;176:468–478. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078>
24. Mayer J, Conrad J, Klaiber I, Lutz-Wahl S, Beifuss U, Fischer L. Enzymatic production and complete nuclear magnetic resonance assignment of the sugar lactulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(23):6983–6990. <https://doi.org/10.1021/jf048912y>
25. Mayer J, Kranz B, Fischer L. Continuous production of lactulose by immobilized thermostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biotechnology*. 2010;145(4):387–393. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.017>
26. Chen Q, Xiao Y, Zhang W, Zhang T, Jiang B, Stressler T, et al. Current research on cellobiose 2-epimerase: Enzymatic properties, mechanistic insights, and potential applications in the dairy industry. *Trends in Food Science and Technology*. 2018;82:167–176. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.009>
27. Chen Q, Xiao Y, Wu Y. Characteristics of cellobiose 2-epimerase and its application in enzymatic production of lactulose and epilactose. In: Mu W, Zhang W, Chen Q, editors. *Novel enzymes for functional carbohydrates production. From scientific research to application in health food industry*. Singapore: Springer; 2021. pp. 105–123. <https://doi.org/10.1007/978-981-3-3-6021-1>
28. Kuschel B, Seitel I, Glück C, Mu W, Orcid, Jiang B, Stressle T, et al. Hidden reaction: Mesophilic cellobiose-2-epimerases produce lactulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(12):2530–2539. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05599>
29. Park A-R, Kim J-S, Jang S-W, Park Y-G, Koo B-S, Lee H-C. Rational modification of substrate binding site by structure based engineering of a cellobiose-2-epimerase in *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Microbial Cell Factories*. 2017;16(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0841-3>
30. Shen Q, Zhang Y, Yang R, Pan S, Dong J, Fan Y, et al. Enhancement of isomerization activity and lactulose production of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Food Chemistry*. 2016;207:60–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.067>
31. Wang L, Gu J, Feng Y, Wang M, Tong Y, Liu Y, et al. Enhancement of the isomerization activity and thermostability of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* by exchange of a flexible loop. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(6):1907–1915. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07073>
32. Chen Q, Levin R, Zhang W, Zhang T, Jiang B, Stressler T, et al. Characterization of a novel cellobiose 2-epimerase from thermophilic *Caldicellulosiruptor obsidiansis* for lactulose production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017;97(10):3095–3105. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8148>
33. Chen Q, Wu Y, Huang Z, Zhang W, Mu W. Molecular characterization of a mesophilic cellobiose 2-epimerase that maintains a high catalytic efficiency at low temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(29):8268–8275. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02025>
34. Gu J, Yang R, Hua X, Zhang W, Zhao W. Adsorption-based immobilization of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* cellobiose 2-epimerase on *Bacillus subtilis* spores. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2015;62(2):237–244. <https://doi.org/10.1002/bab.1262>
35. Kim J-E, Kim Y-S, Kang L-W, Oh D-K. Characterization of a recombinant cellobiose 2-epimerase from *Dictyoglomus turgidum* that epimerizes and isomerizes β -1,4 and α -1,4-gluco-oligosaccharides. *Biotechnology Letters*. 2012;34(11):2061–2068. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0999-z>
36. Kim Y-S, Kim J-E, Oh D-K. Borate enhances the production of lactulose from lactose by cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Bioresource Technology*. 2013;128:809–812. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.060>
37. Rentschler E, Schuh K, Krewinkel M, Baur C, Claaßen W, Meyer S, et al. Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. *Journal of Dairy Science*. 2015;98(10):6767–6775. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9900>
38. Panesar PS, Kumari S. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances*. 2011;29(6):940–948. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.008>
39. Wang H, Yang R, Hua X, Zhao W, Zhang W. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(14):6167–6180. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4998-3>
40. Vaheri M, Kaupinnen V. The formation of lactulose (4-O- β -galactopyranosylfructose) by β -galactosidase. *Acta Pharmaceutica Fennica*. 1978;87:75–83.
41. Lee Y-J, Kim CS, Oh D-K. Lactulose production by beta-galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;64(4):787–793. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1506-1>
42. Adamczak M, Charubin D, Bednarski W. Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chemical Papers*. 2009;63:111–116. <https://doi.org/10.2478/s11696-009-0010-1>

43. Fattahi H, Zokaee F, Bonakdarpour B, Hashemi SA, Khatami SH. Enzymatic synthesis of lactulose by commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Afinidad*. 2010;67(546):149–153.
44. Hua X, Yang R, Zhang W, Fei Y, Jin Z, Jiang B. Dual-enzymatic synthesis of lactulose in organic-aqueous two-phase media. *Food Research International*. 2010;43(3):716–722. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.008>
45. Guerrero C, Vera C, Plou F, Illanes A. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β -galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011;72(3–4):206–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.007>
46. Shen Q, Yang R, Hua X, Ye F, Wang H, Zhao W, *et al.* Enzymatic synthesis and identification of oligosaccharides obtained by transgalactosylation of lactose in the presence of fructose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Food Chemistry*. 2012;135(3):1547–1554. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.115>
47. Song YS, Shin HY, Lee JY, Park C, Kim SW. β -Galactosidase-immobilised microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilisation and its application for continuous synthesis of lactulose. *Food Chemistry*. 2012;133(3):611–617. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.096>
48. Song YS, Suh YJ, Park C, Kim SW. Improvement of lactulose synthesis through optimization of reaction conditions with immobilized β -galactosidase. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2013;30(1):160–165. <https://doi.org/10.1007/s11814-012-0105-1>
49. Song YS, Lee HU, Park C, Kim SW. Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β -galactosidase. *Food Chemistry*. 2013;136(2):689–694. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.074>
50. Hua X, Yang R, Shen Q, Ye F, Zhang W, Zhao W. Production of 1-lactulose and lactulose using commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the presence of fructose. *Food Chemistry*. 2013;137(1–4):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.003>
51. Khatami S, Ashtiani FZ, Bonakdarpour B, Mehrdad M. The enzymatic production of lactulose via transglycosylation in conventional and non-conventional media. *International Dairy Journal*. 2014;34(1):74–79. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.010>
52. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Continuous synthesis of lactulose in an enzymatic membrane reactor reduces lactulose secondary hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2014;167:108–115. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.124>
53. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Rapid transgalactosylation towards lactulose synthesis in a small scale enzymatic membrane reactor (EMR). *Chemical Engineering Transactions*. 2014;38:19–24. <https://doi.org/10.3303/CET1438004>
54. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Influences of operating conditions on continuous lactulose synthesis in an enzymatic membrane reactor system: A basis prior to long-term operation. *Journal of Biotechnology*. 2015;203:89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.016>
55. Guerrero C, Vera C, Conejeros R, Illanes A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*. 2015;70:9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
56. De Albuquerque TL, Gomes SDL, D’Almeida AP, Fernandez-Lafuente R, Gonçalves LRB, Rocha MVP. Immobilization of β -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. *Process Biochemistry*. 2018;73:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.010>
57. Schmidt CM, Nedele A-K, Hinrichs J. Enzymatic generation of lactulose in sweet and acid whey: Feasibility study for the scale up towards robust processing. *Food and Bioprocess Processing*. 2020;119:329–336. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.11.015>
58. Schmidt CM, Balinger F, Conrad J, Günther J, Beifuss U, Hinrichs J. Enzymatic generation of lactulose in sweet and acid whey: Optimization of feed composition and structural elucidation of 1-lactulose. *Food Chemistry*. 2020;305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125481>
59. de Freitas MFM, Hortêncio LC, de Albuquerque TL, Rocha MVP, Gonçalves LRB. Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2020;43(4):711–722. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02270-y>
60. Guerrero C, Vera C, Araya E, Conejeros R, Illanes A. Repeated-batch operation for the synthesis of lactulose with β -galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking. *Bioresource Technology*. 2015;190:122–131. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.039>
61. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Development of a continuous membrane reactor process for enzyme-catalyzed lactulose synthesis. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;109:65–80. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.006>
62. Guerrero C, Vera C, Illanes A. Synthesis of lactulose in batch and repeated-batch operation with immobilized β -galactosidase in different agarose functionalized supports. *Bioresource Technology*. 2017;230:56–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.037>
63. Guerrero C, Vera C, Serna N, Illanes A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. *Bioresource Technology*. 2017;232:53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.003>

64. Guerrero C, Valdivia F, Ubilla C, Ramírez N, Gómez M, Aburto C, et al. Continuous enzymatic synthesis of lactulose in packed-bed reactor with immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Bioresource Technology*. 2019;278:296–302. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.018>
65. Ubilla C, Ramírez N, Valdivia F, Vera C, Illanes A, Guerrero C. Synthesis of lactulose in continuous stirred tank reactor with β -galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in monofunctional glyoxyl agarose support. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00699>
66. Guerrero C, Aburto C, Suarez S, Vera C, Illanes A. Improvements in the production of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase crosslinked aggregates and their use in repeated-batch synthesis of lactulose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;142:452–462. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.117>
67. Serey M, Vera C, Guerrero C, Illanes A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;167:1564–1574. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.110>
68. Ramírez N, Ubilla C, Campos J, Valencia F, Aburto C, Vera C, et al. Enzymatic production of lactulose by fed-batch and repeated fed-batch reactor. *Bioresource Technology*. 2021;341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125769>
69. Zimmer FC, Souza AHP, Silveira AFC, Santos MR, Matsushita M, Souza NE, et al. Application of factorial design for optimization of the synthesis of lactulose obtained from whey permeate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2017;28(12):2326–2333. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170083>
70. Illanes A. Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2011;14(6).
71. Shen Q, Zhang Y, Yang R, Hua X, Zhang W, Zhao W. Thermostability enhancement of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* by site-directed mutagenesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2015;120:158–164. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.07.007>
72. Karim A, Gerliani N, Aïder M. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*. 2020;333. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
73. Lyutova LV, Naumov GI, Shnyreva AV, Naumova ES. Molecular polymorphism of β -galactosidase *LAC4* genes in dairy and natural strains of *Kluyveromyces* yeasts. *Molecular Biology*. 2021;55(1):75–85. (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0026898421010109>
74. Naumova ES, Sadykova AZ, Michailova YuV, Naumov GI. Polymorphism of lactose genes in the dairy yeasts *Kluyveromyces marxianus*, potential probiotic microorganisms. *Microbiology*. 2017;86(3):335–343. (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S0026365617030144>
75. Ryabtseva SA, Skripnyuk AA, Kotova AA, Khramtsov AG, Rodnaya AB, Lodygin AD, et al. Method for combined enzyme beta-galactosidase production. *Russia Patent Ru 2622078C1*. 2017.
76. Panesar PS, Kumari S, Panesar R. Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*. 2010;2010. <https://doi.org/10.4061/2010/473137>
77. Córdova A, Henríquez P, Nuñez H, Rico-Rodríguez F, Guerrero C, Astudillo-Castro C, et al. Recent advances in the application of enzyme processing assisted by ultrasound in agri-foods: A review. *Catalysts*. 2022;12(1). <https://doi.org/10.3390/catal12010107>
78. Geciova J, Bury D, Jelen P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry – A review. *International Dairy Journal*. 2002;12(6):541–553. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00038-9)
79. Ajisaka K, Nishida H, Fujimoto H. Use of an activated carbon column for the synthesis of disaccharides by use of a reverse hydrolysis activity of β -galactosidase. *Biotechnology Letters*. 1987;9:387–392.
80. Kim Y-S, Park C-S, Oh D-K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(4):903–908. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.023>
81. Hashem AM, Ismail SAE, Helmy WA, El-Mohamady Y, Abou-Romia R. Factors affecting the production of lactulose by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495 β -galactosidase and its biological activity. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2013;9(1):1–6. <https://doi.org/10.21161/mjm.43612>
82. Wang H, Yan R, Hua X, Zhang W, Zhao W. An approach for lactulose production using the cotx-mediated spore-displayed β -galactosidase as a biocatalyst. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016;26(7):1267–1277. <https://doi.org/10.4014/jmb.1602.02036>
83. Letsididi R, Hassanin HAM, Koko MYF, Zhang T, Jiang B, Mu W. Lactulose production by a thermostable glycoside hydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Caldivirga maquilingensis* IC-167. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018;98(3):928–937. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8539>
84. Montanari G, Zambonelli C, Grazia L, Benevelli M, and Chiavari C. Release of β -galactosidase from *Lactobacilli*. *Food Technology and Biotechnology*. 2000;38(2):129–133.
85. Tang L, Li Z, Dong X, Yang R, Zhang J, Mao Z. Lactulose biosynthesis by β -galactosidase from a newly isolated *Arthrobacter* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011;38(3):471–476. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0897-0>

86. Lorenzen PChr, Breiter J, Clawin-Rädecker I, Dau A. A novel bi-enzymatic system for lactose conversion. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013;48(7):1396–1403. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12101>
87. Song Y-S, Lee H-U, Park C, Kim S-W. Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β -galactosidase and glucose isomerase. *Carbohydrate Research*. 2013;369:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.01.002>
88. Sato H, Saburi W, Ojima T, Taguchi H, Mori H, Matsui H. Immobilization of a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Rhodothermus marinus* JCM9785 and continuous production of epilactose. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2012;76(8):1584–1587. <https://doi.org/10.1271/bbb.120284>
89. Kim Y-S, Oh D-K. Lactulose production from lactose as a single substrate by a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Bioresource Technology*. 2012;104:668–672. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.016>
90. Wu L, Xu C, Li S, Liang J, Xu H, Xu Z. Efficient production of lactulose from whey powder by cellobiose 2-epimerase in an enzymatic membrane reactor. *Bioresource Technology*. 2017;233:305–312. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.089>
91. Wang M, Wang H, Feng Y, Xu Q, Admassu H, Yang R, *et al.* Preparation and characterization of sugar-assisted cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(29):7712–7721. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02333>
92. Xiao Y, Chen Q, Shakhnovich EI, Zhang W, Mu W. Simulation-guided enzyme discovery: A new microbial source of cellobiose 2-epimerase. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;139:1002–1008. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.075>
93. Botelho VA, Mateus M, Petrus JCC, de Pinho MN. Membrane bioreactor for simultaneous synthesis and fractionation of oligosaccharides. *Membranes*. 2022;12(2). <https://doi.org/10.3390/membranes12020171>
94. Maráz A, Kovács Z, Benjamins E, Pázmándi M. Recent developments in microbial production of high-purity galacto-oligosaccharides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;38(6). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03279-4>
95. Julio-Gonzalez LC, Hernandez-Hernandez O, Moreno FJ, Olano A, Corzo N. High-yield purification of commercial lactulose syrup. *Separation and Purification Technology*. 2019;224:475–480. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.05.053>
96. Guerrero C, Vera C, Illanes A. Selective bioconversion with yeast for the purification of raw lactulose and transgalactosylated oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 2018;81:131–137. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.02.003>
97. Huang Z, Huang L, Xing G, Xu X, Tu C, Dong M. Effect of co-fermentation with lactic acid bacteria and *K. marxianus* on physicochemical and sensory properties of goat milk. *Foods*. 2020;9(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030299>
98. Wilson L, Illanes A, Ottone C, Romero O. Co-immobilized carrier-free enzymes for lactose upgrading. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2021;33. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100553>