



利用纤维二糖差向异构酶制备乳果糖的研究进展

徐铮^{1*}, 张倩², 李克文², 徐虹¹

¹南京工业大学食品与轻工学院, 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

²保龄宝生物股份有限公司, 山东 禹城 251200

摘要: 乳果糖是由 D-半乳糖和 D-果糖两个基团通过 β -1,4 糖苷键连接而成的还原型二糖; 乳果糖口服液具有治疗慢性便秘和肝性脑病的功效, 在 100 多个国家作为常见非处方药(OTC)使用, 需求量十分巨大; 乳果糖还可以作为益生元改善人体肠道菌群关系。乳果糖的生产依赖化学法, 其催化剂对人体有害, 下游分离难度大。近年来, 纤维二糖差向异构酶被发现能够高效催化乳糖制备乳果糖, 该技术绿色环保、步骤简单, 具有很强的产业化前景。本文结合自身研究经历对纤维二糖差向异构酶的研发情况进行总结, 并综述了乳果糖酶法制备技术的现状。

关键词: 乳果糖, 纤维二糖差向异构酶, 生物催化, 益生元, 便秘, 肝性脑病

乳果糖(lactulose), 分子式 $C_{12}H_{22}O_{11}$ 、分子量 342.3、CAS 号 4618-18-2, 别名乳酮糖、异构化乳糖、4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-果糖等, 是 D-半乳糖和 D-果糖以 β -1,4-糖苷键连接而成的二糖(图 1), 易溶于水(20 °C 时溶解度达到 2060 g/L), 熔点 168.5–170.0 °C^[1–5]。1930 年 Montgomery 和 Hudson 就在 JACS 杂志发表了乳果糖的化学合成方法^[6], 从此乳果糖的应用研究进入了科学家的视野。药效分析研究表明, 乳果糖具有治疗慢性便秘和肝性脑病的功效, 例如每天摄入 10–40 g 就可以缓解便秘, 每天摄入 90 g 则可以治疗肝性脑病^[7]。

服用乳果糖不会产生任何代谢毒物, 对人体非常安全(LD₅₀ 大于 10 g/kg 体重), 全球已有 100 多个国家注册了乳果糖相关的药物。此外, 在荷兰、日本、意大利等国, 乳果糖还可以作为食品添加剂销售。它属于渗透性泻药也是优异的肠道益生元, 不会被小肠吸收从而到达结肠, 促使乳酸菌、双歧杆菌等肠道益生菌大量繁殖并发酵产生低分子有机酸, 降低肠道 pH 值; 保留肠道水分软化大便, 同时抵制梭菌、沙门氏菌等有害微生物的生长^[8–9]。复旦大学附属华东医院报道乳果糖口服液对老年便秘患者具有显著的疗效, 有效率达

基金项目: 江苏省六大人才高峰(NY-056); 2016 年泰山产业领军人才(传统产业创新类)

*通信作者。Tel/Fax: +86-25-58139433; E-mail: xuzheng@njtech.edu.cn

收稿日期: 2020-03-26; 修回日期: 2020-05-20; 网络出版日期: 2020-07-24

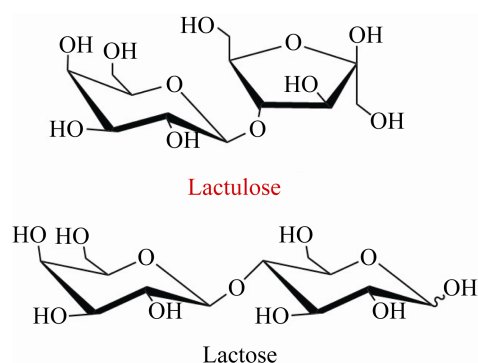


图 1. 乳果糖(lactulose)和乳糖的化学结构式

Figure 1. The chemical structures of lactulose and lactose.

79.2%，与对照组相比有统计学差异；乳果糖治疗的不良反应率低，安全性好，而且可以调节老年人失调的肠道菌群^[10]。由于便秘在老年人中易导致排使用力过度引起的急性心肌梗死、脑血管意外等危重疾病，而长期使用酚酞、番泻叶、大黄等刺激型泻药又可能导致结肠黑病变甚至不可逆的肠神经损害，因此乳果糖对老年人便秘病患较为友好。上海交通大学医学院也报道了乳果糖对妊娠期妇女便秘的治疗效果，结果表明效果显著、副作用小、患者治疗满意度达 90.8%^[11]；雷衍蔚等报道乳果糖对 120 例小儿功能性便秘的治疗有效率达 85%，远高于对照组的 41.6%^[12]；MacGillivray 等报道奶粉中如果添加乳果糖，婴儿长期饮用后的肠道菌群会和母乳喂养组非常接近，而没有添加乳果糖则无此效果，说明乳果糖也有很好的益生元功效^[13]。事实上乳果糖除作为便秘药以外，还是人类商业化使用的第一款益生元；但由于其在早期开发阶段被归类为药品，因此大多数国家仍然习惯作为药物来宣传、销售和使用，2009 年全球对乳果糖的需求量已达到 5 万 t 并且持续增长，预计 2020 年后达到 10 万 t。

商品化的乳果糖口服液是乳果糖占主要比例的糖浓溶液，颜色微黄、无异味、口感较甜(甜度为蔗糖的 0.6–0.8 倍)。其中乳果糖浓度一般为 667 g/L (或为 634–700 g/L)，另外还含有 20% 左右的杂糖，包括乳糖(≤ 90 g/L)、D-半乳糖(≤ 150 g/L)、依匹乳糖(≤ 70 g/L)、D-塔格糖(≤ 30 g/L)、D-果糖(≤ 10 g/L)，是治疗便秘、肝性脑病的有效药物(非处方药 OTC 类)^[14]。具有国内生产许可资质的主要口服液制剂销售厂家包括雅培(荷兰)公司(商品名：杜密克)、北京韩美药品有限公司(商品名：利动)、奥地利费森尤斯卡比公司、山德士(中国)制药有限公司、四川健能制药有限公司、湖南科伦制药有限公司、丹东康复制药有限公司等。截止目前，乳果糖的工业化生产完全依靠化学催化法，使用诸如硼酸、偏铝酸钠等有毒或重金属型催化剂，需要专用树脂完全吸附掉多余硼或铝，没有任何残留后才是合格产品^[15]。由于化学催化剂的用量较大，因此彻底去除非常困难，且色素和副产物产生较多，对下游技术有很高的要求，产业化具有一定难度。化学法也可以使用氢氧化钙、氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钾、氧化镁等进行催化，但遇到转化率低、副产物多等类似的问题^[16]。跨国企业利用技术优势占据了我国乳果糖口服液产品的几乎全部市场，我国企业则边缘化严重，开发生物技术生产乳果糖是打破这一垄断的最可行路线。生物技术制备乳果糖的工艺一般依靠 β -半乳糖苷酶或纤维二糖差向异构酶(cellobiose 2-epimerase, 简称 CE 酶)两种酶，均以乳糖作为催化底物。前者的转化率很低，而且需要在乳糖解离后外源加入 D-果糖作为第二底物才能合成出乳果糖^[17–19]，因此反应体系中存在单糖和二糖等多种糖类，产品分离难度极大，而

且转化率很低(小于 20%), 普遍认为不具备工业化前景; 采用纤维二糖差向异构酶的技术催化转化率高, 根据报道, 对于 700 g/L 高浓度的乳糖底物, 催化转化率可以达到 58%左右, 与硼或铝为催化剂的化学法(转化率一般 75%以上)的差距大为缩小^[20]。生物法中使用最多的是来源于嗜热微生物 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 的纤维二糖差向异构酶(简称 CSCE 酶), 该酶的研究报道近来很多, 使用最为广泛; 此外还有来源于 *Dictyoglomus turgidum*、*Caldicellulosiruptor obsidiansis*、*Dictyoglomus thermophilum* 来源的纤维二糖差向异构酶也适合生产乳果糖^[21-24]。值得注意的是, 绝大多数已发现的纤维二糖差向异构酶不产乳果糖而是产依匹乳糖(epilactose, 又名表乳糖, 由 D-半乳糖和 D-甘露糖以 β -1,4-糖苷键结合而成的二糖), 例如包括 *Cellulosilyticum lentocellum*、*Dysgonomonas gadei*、*Flavobacterium johnsoniae*、*Pedobacter heparinus*、*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*、*Ruminococcus albus*、*Rhodothermus marinus*、*Spirochaeta thermophila*、*Eubacterium cellulosolvens*、*Bacteroides fragilis* 等来源的纤维二糖差向异构酶催化乳糖若干小时, 均只产生依匹乳糖^[25-32], 这说明以上纤维二糖差向异构酶具有很强的差向异构反应能力, 但醛酮糖异构反应能力不强。

1 已报道的纤维二糖差向异构酶

CE 酶曾被认为是 AGE 酶(N-乙酰-D-氨基葡萄糖 2-差向异构酶、EC 5.1.3.8)家族的成员, 但由于 AGE 酶一般需要 ATP 参与反应, 而 CE 酶并不需要任何辅酶, 且两种酶的序列相似度很低, 因此近年来将 CE 酶单独划为纤维二糖差向

异构酶。早在 1967 年 Tyler 和 Leatherwood 就研究了革兰氏阳性菌 *Ruminococcus albus* (白色瘤胃球菌)来源的 CE 酶, 发现它可以催化纤维二糖产生葡萄糖基甘露糖^[33], 然而 CE 酶成为研究热点却是在 40 多年后。2011 年韩国的 Park 等发现 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 来源 CE 酶(CSCE)可以催化单糖 D-葡萄糖产生 D-甘露糖(同时产生副产物 D-果糖)^[34], 由于 D-甘露糖的应用价值, 很快 CE 酶得到了重视。仅一年后通过继续研究, Kim 和 Oh 又发现 CSCE 酶可以催化乳糖产生乳果糖^[20], 自此拉开了 CE 酶应用于乳果糖合成的序幕。乳糖的溶解度随温度变化很大, 其中 0 °C 下溶解度仅为 11.9% (W/W), 而 74 °C 却达到 86.2% (W/W)^[35], 这表明高的反应温度可以溶解更多的乳糖, 从而提高产物浓度和生产强度。已报道可以产乳果糖的 CE 酶均具有较高的反应温度, 在 70–80 °C; 温度还可以影响 CE 酶催化醛酮糖异构(乳糖变为乳果糖)和差向异构(乳糖变为依匹乳糖)的产物比例, Park 等发现 CSCE 酶在 65 °C 下的醛酮糖异构活性是 37 °C 下的 12 倍, 而差向异构活性仅为 37 °C 下的 27%^[36]。因此提高反应温度对高产乳果糖和降低依匹乳糖含量有很大帮助。由表 1 可知, 目前已知的利用纤维二糖差向异构酶催化乳糖得到乳果糖的报道中, 都会得到依匹乳糖这一反应副产物, 包括 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*、*Dictyoglomus turgidum*、*Dictyoglomus thermophilum*、*Caldicellulosiruptor obsidiansis* 等来源(这里均指野生型酶), 所产依匹乳糖的含量大约为 11%–16% (W/W)^[20-24]。依匹乳糖的结构与乳糖和乳果糖都非常相似, 属于同分异构体, 因此分离极为困难^[37], 目前还没有产业化规模下分离成功的报道。

表 1. 已报道催化乳糖能够产生乳果糖的纤维二糖差向异构酶

Table 1. Reported cellobiose 2-epimerase that produced lactulose from lactose

Original microorganisms	Optimal temperature/°C	Optimal pH	Specific activity/(U/mg)	Catalytic efficiency [1/min 1/(mmol/L)]	Lactose:epilactose:lactulose	References
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	80	7.5	10.8	0.55 7.05 (1/s)	27:15:58	[20,23,40]
CSCE mutant R5M/152V/A12S/K328I/F231L	80	7.5	30.1	21.0 (1/s)	24:0:76	[40]
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	70	7.0	14.2	1.12 0.51	32.9:12.8:54.3	[21,23]
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	85	7.0	160.1 (epimerization); 3.52 (isomerization)	0.84 (1/s)	NR	[24]
<i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i>	70	7.5	93.6	0.77 (1/s)	35:11:54	[22]

NR: not reported.

为了克服这一困难, Kim 等提出在生物催化的过程中添加化学催化剂硼酸, 可以使得依匹乳糖的含量降低到 2% 的水平^[38]。其原理是硼酸可以和酮糖(乳果糖)形成络合物, 使酮糖脱离反应体系, 导致反应平衡向更多酮糖产物生成方向移动。由于依匹乳糖不含酮基, 因此在硼酸体系中含量会大幅下降。硼酸的使用也见于 D-塔格糖等稀少糖的催化研究中^[39], 然而硼酸的使用量较大, 而硼是禁止出现在食品中的, 因此必须完全去除才能符合法律标准。但作为一种弱酸, 想要完全去除非常困难, 即使价格昂贵的专用树脂也比较困难, 因此这一方法的产业化价值有限。尽管许多糖基异构酶都被证明是金属酶, 金属离子对 CE 酶的活性却没有促进作用, 而且经 EDTA 处理活性也未发生变化, 这表明 CE 酶并不是金属酶^[34]。已报道的 CE 酶热稳定性大多较好, 例如 *Dictyoglomus turgidum* CE 酶在 70 °C 的活性半衰期达到了 55 h^[21]。

2 酶催化制备乳果糖的工艺研究

已报道的生物法制备乳果糖工艺见表 2, 目前

产物乳果糖浓度最高达到 614 g/L, 转化率高可达 88%^[38], 但反应体系添加了较高浓度的硼酸。在不添加硼酸的情况下, 产物浓度最高为 408 g/L, 此时转化率为 58%^[20]。生产强度最高的工艺中, 添加硼酸组为 205 g/L, 不添加为 204 g/L, 水平相当。所有催化工艺都可以在 2–4 h 完成催化, 显示了较快的反应速度。反应体系中酶的用量差异则较大, 在 12.5–150.0 U/mL 的范围内均完成了催化。由以上数据可知, CE 酶催化乳糖制备乳果糖的速度是比较快的, 产物浓度和生产强度也接近了产业化的水平, 因此使用该酶作为工业酶理论上可行。由于 CE 酶生产乳果糖的催化温度很高, 降低反应温度又会显著降低底物转化率, 因此固定化 CE 酶体系必须能够长时间耐受高温, 这对固定化材料和酶本身都提出了很高的要求。目前有一些固定化体系获得了成功, 江南大学的 Gu 等通过吸附法将 CE 酶固定化在枯草芽孢杆菌的芽孢上, 固定量最高达到 1.47 mg 每 10¹¹ 个芽孢, 酶回收率为 79.4%。固定化芽孢在 4 h 内获得 56.4% 转化率, 乳果糖浓度 395 g/L, 重复使用 8 批次后芽孢残留有 70% 的酶活^[41]。Wang 等也尝试将 CSCE 酶固定化在商业化的 Doulite A568 树脂上,

表 2. 已报道的生物法制备乳果糖生产工艺
Table 2. Reported bio-production progresses of lactulose

Bio-catalyst	Substrate concentration/(g/L)	Lactulose concentration/yield	Productivity/[g/(L·h)]	Enzyme loading/(U/mL)	Reaction time/h	References
CSCE enzyme	700	408 g/L (58%)	204	150	2	[20]
CSCE enzyme	700 (addition of 120 g/L boric acid)	614 g/L (88%)	205	150	3	[38]
CSCE mutant enzyme R5M/I52V/A12S/K328I/F231L	500	380 g/L (76%)	95	3 g/L	4	[40]
Immobilized CSCE enzyme	600	350 g/L (58.3%)	87.5	12.5	4	[42]
Permeabilized <i>E. coli</i> cells (expressing CSCE)	600	390.6 g/L (65.1%)	195.3	12.5	2	[43]
Immobilized CSCE enzyme	700	395 g/L (56.4%)	98.8	100	4	[41]
COCE enzyme	200	108 g/L (54%)	27	120	4	[22]

固定化使用的是纯酶。纯化方法是在 70 °C 热处理破碎细胞液 2 h, 失活杂蛋白后直接得到较纯的 CSCE 酶, 纯酶回收率达到 86.6%。固定化时利用酶与树脂的静电吸附作用, 同时加入戊二醛交联, 该固定化酶重复使用 15 批次后仍有 90% 的酶活^[42]。

3 纤维二糖差向异构酶的催化机理

一般认为只有高温 CE 酶才可以催化乳糖产生乳果糖, 而常温型 CE 酶则只能产生依匹乳糖。但近来研究表明, 通过延长反应时间, 常温型酶也可以大量产生乳果糖。Kuschel 等选取了 7 种常温型 CE 酶, 在 10 °C 的较低温度下催化乳糖长达 21 d 后, 最高获得了 56.8% 的乳果糖, 依匹乳糖含量 13.3%, 这与高温型酶的催化结果类似^[44]。而与之对比, 反应仅 5 min, 就可以获得最高 30% 的依匹乳糖。这一结果表明, CE 酶催化乳糖首先产生依匹乳糖; 继续延长反应时间, 高温酶能够在短时间内产生乳果糖并达到反应平衡; 而常温型酶则需要更长的时间才能产生乳果糖, 但在较长的反应时间后也可以达到反应平衡, 因此 CE

酶催化的差向异构反应速率要远高于醛酮糖异构反应。而且, 乳果糖的形成似乎有两条途径, 即直接从乳糖异构化得到, 以及从依匹乳糖间接转化而来^[45]。糖基醛酮糖异构酶或差向异构酶的催化机制包括烯二醇中间体机制 (cis-enediol intermediate mechanism) 和氢负离子转移机制 (hydride-shift mechanism), 前者主要代表有 L-阿拉伯糖异构酶、D-塔格糖 3-差向异构酶等^[46-47], 后者包括 D-木糖异构酶和 L-鼠李糖异构酶等^[48-49]。两种反应机理的研究均较为透彻, CE 酶通过晶体结构分析表明属于烯二醇中间体机制^[50]。以 *Rhodothermus marinus* 来源 CE 酶催化纤维二糖为例, 在反应开始时, 通过 H390 作为广义酸或碱来打开葡萄糖基糖环(底物为乳糖时同样打开葡萄糖基糖环); 开环后再由 H390 残基夺取糖链中 C-2 位的质子形成烯二醇中间体(C1-C2 间形成双键), 然后再由 H259 提供质子使得中间体发生转化形成开环的产物, 最终再经过闭环反应成为终产物; H200 也起到了稳定反应中间体的作用^[51]。而在 *Ruminococcus albus* 来源的 CE 酶中组氨酸同样是催化残基, H243 和 H374 扮演了广

义酸碱催化剂的角色, H184 也被发现对催化起到关键作用^[52]。因此 CE 酶的底物催化过程主要是由 3 个组氨酸残基配合完成的, 组氨酸的不同质子化状态使得反应能够以可逆的方式进行。由于组氨酸的等电点接近中性, 因此在中心环境下才适合释放与接收质子; 这从机理上解释了为什么 CE 酶只能在中性条件下才具有比较高的酶活力, 过酸和过碱都能够大幅降低酶的活性。

4 针对纤维二糖差向异构酶的改造研究

尽管纤维二糖差向异构酶催化乳糖的效率较高, 但仍然存在诸多问题; 首先是副产物依匹乳糖的比例过高, 尽管依匹乳糖本身也是一种人体益生元^[53-56], 但各国药典对其含量均有严格限制。蛋白质工程改造是解决这一难题的途径, 其中定向进化显示了这方面的优势。Shen 等通过定向进化筛选到了五位点突变体 R5M/I52V/A12S/K328I/F231L, 该突变体并不产生副产物依匹乳糖^[40],

说明定向进化是非常有效的纤维二糖差向异构酶改造方法。此外, 根据 PDB 数据库中已发布的 CE 酶晶体结构数据, 通过分子同源建模和理性设计的方法, 也可以对 CE 酶进行有效改造。截止目前, PDB 数据库共有 5 种 CE 酶的晶体结构(表 3), 已报道的 CE 酶多为单体酶, 分子量 43–47 kDa。分析多种来源的 CE 酶表明氨基酸序列相似度在 35%–50%, 氨基酸序列保守区包括 No. 50–60、No. 180–200、No. 240–260、No. 300–330、No. 370–390 等区域的残基。笔者通过分析 CSCE 酶结晶结构发现, 不同来源 CE 酶的活性口袋相似度很高, 其中的氨基酸残基相当保守且有一定的疏水性, 针对这些残基的定点突变实验都导致了酶活力大幅下降或彻底失活(结果尚未发表), 这些残基的编号和推测功能如表 4 所述。Ito 等分析了 *Ruminococcus albus* 来源 CE 酶(以依匹乳糖为产物)的重要氨基酸残基, 结果表明无论底物是纤维二糖还是乳糖, R52、H243、E246、W249、W304、E308 和 H374 残基都是催化必需残基, F114 和 W303 也对催化有重要贡献^[57]。Park 等分析 CSCE

表 3. PDB 数据库中已发布的 CE 酶晶体结构

Table 3. Published crystal structures of cellobiose 2-epimerase in the PDB database

Originals	Molecular weight determined by SDS-PAGE/kDa	Oligomeric state	PDB ID	Published data	References
<i>Rhodothermus marinus</i>	NR	NR	3WKF, <i>apo</i> structure 3WKG, <i>holo</i> structure with glucosylmannose 3WKH, <i>holo</i> structure with epilactose 3WKI, <i>holo</i> structure with cellobiitol	12/5/2013	[51]
<i>Ruminococcus albus</i>	43.1	Monomer	3VW5, <i>apo</i> structure	6/26/2013	[52]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	47	Monomer	4Z4J, <i>apo</i> structure 4Z4L, <i>apo</i> structure	4/13/2016	Not published
<i>Bacillus thermoamylovorans</i> B4167	NR	NR	5ZHB, <i>apo</i> structure	6/19/2019	Not published
<i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192	47	Monomer	5ZIG, <i>apo</i> structure	4/10/2019	Not published

NR: not reported.

表 4. CE 酶活性中心关键氨基酸残基一览*
Table 4. Essential residues in the active site of cellobiose 2-epimerase*

Residues	Predicted functions	Residues interacted with the side chain
R66 (R56)	Interacted with No. 5 oxygen atom and No. 6 hydroxyl group of substrate	Y124, W385
Y124 (Y113)	Interacted with No. 2 hydroxyl group of substrate	R66
N196 (N184)	Interacted with No. 2 and 3 hydroxyl group of substrate	H259
H200 (H188)	A catalytic residue, interacted with No. 1 and 2 hydroxyl group of substrate	None
H259 (H247)	A catalytic residue, interacted with No. 3 hydroxyl group of substrate	N196, S256
E262 (E250)	Interacted with No. 1 hydroxyl group of substrate	Y389, R393
W322 (W308)	Stabilizing substrate via π - π interaction	None
W385 (W373)	Stabilizing substrate via π - π interaction	R66
H390 (H377)	A catalytic residue, interacted with No. 5 oxygen atom and No. 1 hydroxyl group of substrate	None

*According to the crystal structure of *Rhodothermus marinus* CE enzyme (PDB ID: 3WKG), and residue numbers in brackets are corresponded to the CSCE enzyme.

酶活性中心与甘露糖基团 C-2 位的作用情况, 选择 Y114 和 N184 两个残基位点进行饱和突变研究。结果表明在所得突变体中, Y114E 催化 200 g/L 乳糖生产乳果糖的转化率为 43.5% (产物浓度 86.9 g/L), 尽管转化率不高但依匹乳糖的浓度仅为 4.6 g/L (转化率 2.3%), 这可能是因为突变体丧失了大部分的差向异构化能力^[36]。针对热稳定性的突变研究也有报道, Shen 等发现双位点突变 E161D/N365P 在高温下的活性半衰期提高了 4 倍, 最适反应温度也从 80 °C 提高到 87.5 °C, 对底物乳糖的催化效率 k_{cat}/K_m 上升了 29%^[58]。

5 CE 酶在食品级宿主中的表达应用

大肠杆菌因其清晰的分子遗传背景、成熟的基因操作方法、顶级的生长繁殖速度而被生物工程领域视为首选的微生物宿主, 已报道的 CE 酶研究大多在大肠杆菌中实现了克隆表达和发酵过程研究。然而大肠杆菌易产内毒素, 难以在食品领

域应用, 因此开发食品级的微生物宿主来表达 CE 酶具有重要的现实意义。包括枯草芽孢杆菌、毕赤酵母等食品级宿主已被尝试用于 CE 酶表达研究, 韩亮等将 CSCE 基因经过密码子优化后克隆到 pPIC9K 分泌型表达载体, 再引入到毕赤酵母 GS115 中表达成功。甲醇诱导 144 h 后摇瓶发酵上清酶活为 0.42 U/mL, 纯化后的重组酶与野生型酶性质接近, 说明酵母宿主潜在的糖基化作用并没有对酶活性造成负面影响^[59]。由于毕赤酵母是适合于高密度发酵的微生物宿主, 因此经过高密度发酵后酶活力可能有大幅度的提升。此外, 外源基因的拷贝数、甲醇含量的在线控制都会对 CE 酶基因表达产生重要影响, 然而相关研究还较为缺乏。江南大学的王鑫森等将嗜热网球菌 (*Dictyoglomus thermophilum*) 来源 CE 酶基因连接 pBSuL3 载体, 导入枯草芽孢杆菌 CCTCC M2016536 中, 表达后胞内酶活达到 7.5 U/mL。在乳糖浓度 400 g/L、反应温度 85 °C、加酶量

20 U/mL 条件下, 乳果糖转化率达 51%^[60]。笔者将 CSCE 基因克隆到 pMA09 载体并转化枯草芽孢杆菌 WB800 进行表达, 16 h 后在 7.5 L 发酵罐获得了 5.3 U/mL 的发酵上清酶活力。将酶液(浓度 7.5 U/mL)用酶膜固定化制备成 EMR 反应器, 利用乳清中的乳糖进行催化反应, 乳果糖产率达到 58.5%。该反应器反应 10 个批次后还残留有 42.4% 的酶活力^[61], 该工艺能够降低乳果糖的生产成本, 并且排除了食品安全隐患, 具有一定的应用价值。

6 相关知识产权情况

部分已公开的生物法制备乳果糖技术发明专利如表 5 所示, 可见专利申请人主要来自日本、韩国、中国, 表明东亚国家对乳果糖的生物法制备技术有着强烈的兴趣。这可能与东亚国家老龄化严重, 老年人肠胃蠕动功能差、肠道菌群失调、便秘比例较高有关。而且肝病在我国一直属于高发病, 对肝性脑病的治疗也需要使用乳果糖, 因此近年来乳果糖口服液产品在我国保持了很大的需求量。已公开的专利主要保护了用于生产乳果糖的纤维二糖异构酶、固定化酶或细胞生产乳果糖的方法、乳果糖的纯化与结晶方法、纤维二糖异构酶在食品级宿主中的表达方法等。

7 展望

生物法制备乳果糖具有过程绿色环保、无毒性和重金属催化剂使用、副产物种类少、色素少等优势, 具有较好的产业化前景。然而, 生物法还存在许多问题, 例如纤维二糖差向异构酶的酶

活还不够高, 故想要获得高转化率只能降低底物浓度, 造成了生产强度下降; 或者增加了酶的用量, 造成了成本的上升以及过多杂质的引入。这也是许多工业酶面临的问题, 若开发出更高通量的筛选方法, 依靠定向进化或半理性设计较有可能获得酶活力显著提升的突变体。目前乳果糖的检测方法主要通过强酸反应显色, 操作繁琐且误差较大, 不能实现高通量筛选。针对乳果糖的生物传感器(biosensor)或特异性荧光探针的研发可给予这一方向突破性的进展, 例如中国科学院微生物研究所针对乳糖操纵子阻遏蛋白 LacI 基因筛选获得了突变体 LacI-L5, 它只能与乳果糖结合并解除乳糖操纵子表达阻遏, 触发所连接的荧光蛋白基因表达。因此可以利用该突变体作为胞内乳果糖含量的定量筛选工具, 以获得高产乳果糖的突变菌株^[62]。高密度发酵(high cell density cultivation, HCDC)可以大幅提升微生物宿主的菌体密度, 获得更高的重组酶量从而降低成本, 是工业酶产业化的关键技术。这方面需要对发酵过程调控开展深入研究, 目前 CE 酶在这块的研究披露较少, 未来需要更多的相关成果来保障产业化技术的实施。由于乳果糖产品主要涉及药品和食品领域, 因此法律法规建设十分重要, 生物法工艺是否可以获得各国许可? 是否要纳入转基因法规管理? 这些问题都有待于澄清和解决。总的来说, 利用 CE 酶来生产乳果糖在技术上是完全可行的, 在产品质量和工艺成本上都优于化学法。工艺路线可以与大多数酶催化路线兼容, 无需生产线的改造, 相信在不远的未来生物法制备乳果糖会获得广泛的认可。

表 5. 部分已公开的生物法制备乳果糖发明专利
Table 5. Part of published patents for bio-production of lactulose

Patent title	Patent applicant	Patent No.	Application time
Cellobiose 2-epimerase, its preparation and uses	Watanabe et al.	US2012329098A1	02-05-2009 (In Japan)
Method for preparing lactulose from lactose using cellobiose 2-epimerase or N-acetyl glucosamine 2-epimerase	Univ Konkuk Ind Coop Corp Oh and Kim	WO2012115390	02-23-2011 (In Korea)
Production process for concentrated solution of lactulose	Jiangsu Hi-Stone Pharmaceutical Co., Ltd. Wang et al.	WO2015188566	06-11-2014
High-purity epilactose and method for producing the same	Japan Maize Prod Saburi and Yamamoto	JP2011217701A	04-14-2010
Cellobiose 2-epimerase, and application of the same	Japan Maize Prod Univ Hokkaido Saburi et al.	JP2012130332A	11-30-2010
Method for production of lactulose from lactose using by cellobiose 2-epimerase	Univ Konkuk Ind Coop Corp Oh and Kim	KR20120096769A	02-23-2011
Method for production of lactulose from lactose using N-acetyl glucosamine 2-epimerase	Univ Konkuk Ind Coop Corp Oh and Kim	KR20130019309A	08-16-2011
Method of synthesizing lactulose and system for synthesizing lactulose	Univ Korea Res & Bus Found Kim et al.	KR20130101690A	03-06-2012
Microreactor for synthesizing lactulose and method of synthesizing lactulose	Univ Korea Res & Bus Found Kim et al.	KR20130101689A	03-06-2012
Catalyst for synthesizing lactulose and method of synthesizing lactulose	Univ Korea Res & Bus Found Kim et al.	KR101291906B1	03-06-2012
System for synthesizing lactulose using sodium carbonate	Korea Advanced Inst Sci & Tech Han and Seo	KR20150053047A	11-07-2013
System for synthesizing lactulose using ammonium carbonate	Korea Advanced Inst Sci & Tech Han et al.	KR20150048567A	10-28-2013
Lactulose production using immobilized cells	Forbiokorea Co., Ltd Lee et al.	KR101762222B1	10-18-2016
A genetic engineering strain of <i>Bacillus subtilis</i> and its construction and application in lactulose production (authorized patent)	Nanjing Tech University	CN105255805A (Chinese patent)	11-16-2015
A whole cell immobilization method of cellobiose 2-epimerase (authorized patent)	Jiangnan University	CN104313009A (Chinese patent)	10-21-2014
A method of heterologous expression and preparation of cellobiose 2-epimerase in yeast cells	Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; National Animal Husbandry Station	CN106434736A (Chinese patent)	12-21-2016
Recovery and reuse of boric acid in lactulose preparation	Baolingbao Biology Co., Ltd.	CN106589006A (Chinese patent)	12-08-2016
Enzymatic production of lactulose	Shandong Bailong Group Co., Ltd.	CN104805152A (Chinese patent)	12-04-2014
A process for simultaneous production of lactulose and tagatose	Yucheng Lvjian Biotechnology Co., Ltd.	CN102296129A (Chinese patent)	06-16-2011
A production process of crystalline lactulose (authorized patent)	Yucheng Lvjian Biotechnology Co., Ltd.	CN102153598A (Chinese patent)	02-25-2011
A preparation method of high purity lactulose (authorized patent)	Baolingbao Biology Co., Ltd.	CN102020680A (Chinese patent)	01-07-2011

参考文献

- [1] Aider M, de Halleux D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18(7): 356–364.
- [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.
- [3] Olano A, Corzo N. Lactulose as a food ingredient. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(12): 1987–1990.
- [4] Wang H, Yang RJ, Hua X, Zhao W, Zhang WB. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6167–6180.
- [5] Pranami D, Sharma R, Pathak H. Lactulose: a prebiotic, laxative and detoxifying agent. *Drugs & Therapy Perspectives*, 2017, 33(5): 228–233.
- [6] Montgomery EM, Hudson CS. Relations between rotatory power and structure in the sugar group. XXVII. Synthesis of a new disaccharide ketose (lactulose) from lactose. *Journal of the American Chemical Society*, 1930, 52(5): 2101–2106.
- [7] Schumann C. Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *European Journal of Nutrition*, 2002, 41(1): i17–i25.
- [8] Dutta A, Berry SH, El-Omar EM, Hold GL, Mukhopadhyaya A. The effect of lactulose on the faecal microbiota of patients with minimal hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 2017, 152(5): S1049.
- [9] Agarwalla A, Weber A, Davey S, Hamilton K, Goldberg D, Rhim AD, Yang YX. Lactulose is associated with decreased risk of *Clostridium difficile* infection in decompensated cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2017, 15(6): 953–954.
- [10] Zhang Y, Bao ZJ, Zhang GS, Guo ZY, Zhang ZY, Yu XF. Systematic evaluation of the therapeutic effect of lactulose oral solution on functional constipation. *Chinese Journal of Gerontology*, 2015, 35(22): 6470–6473. (in Chinese)
张颖, 保志军, 张赣生, 郭正扬, 张自妍, 于晓峰. 乳果糖口服液治疗功能性便秘疗效的系统评价. *中国老年学杂志*, 2015, 35(22): 6470–6473.
- [11] Lactulose Clinical Research Group. Lactulose for the treatment of constipation in pregnant women: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Chinese Journal of Digestion*, 2006, 26(10): 690–693. (in Chinese)
乳果糖临床协作组. 乳果糖治疗妊娠期妇女便秘的随机、双盲、安慰剂对照多中心临床研究. *中华消化杂志*, 2006, 26(10): 690–693.
- [12] Lei YW, Cheng L, Zhu YB. The effect of lactulose on functional constipation in children. *Clinical Rational Drug Use*, 2012, 5(12): 50–51. (in Chinese)
雷衍蔚, 成玲, 朱彦波. 乳果糖治疗小儿功能性便秘的疗效观察. *临床合理用药杂志*, 2012, 5(12): 50–51.
- [13] MacGillivray PC, Finlay HVL, Binns TB. Use of lactulose to create a preponderance of lactobacilli in the intestine of bottle-fed infants. *Scottish Medical Journal*, 1959, 4(4): 182–189.
- [14] Seki N, Saito H. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. *International Dairy Journal*, 2012, 22(2): 110–115.
- [15] Wang MM, Gasmalla MAA, Tessema HA, Hua X, Yang RJ. Lactulose production from efficient isomerization of lactose catalyzed by recyclable sodium aluminate. *Food Chemistry*, 2017, 233: 151–158.
- [16] De la Fuente MA, Juárez M, de Rafael D, Villamiel M, Olano A. Isomerization of lactose catalyzed by alkaline-substituted sepiolites. *Food Chemistry*, 1999, 66(3): 301–306.
- [17] Hua X, Yang RJ, Shen QY, Ye FY, Zhang WB, 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.
- [18] Lee YJ, Kim CS, Oh DK. Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(6): 787–793.
- [19] 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.
- [20] Kim YS, Oh DK. Lactulose production from lactose as a single substrate by a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Bioresource Technology*, 2012, 104: 668–672.
- [21] Kim JE, Kim YS, Kang LW, Oh DK. 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.

- [22] Chen QM, Levin R, Zhang WL, Zhang T, Jiang B, Stressler T, Fischer L, Mu WM. Characterisation 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.
- [23] Kuschel B, Claaßen W, Mu WM, Jiang B, Stressler T, Fischer L. Reaction investigation of lactulose-producing cellobiose 2-epimerases under operational relevant conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 133(S1): S80–S87.
- [24] Xiao YQ, Chen QM, Shakhnovich EI, Zhang WL, Mu WM. Simulation-guided enzyme discovery: a new microbial source of cellobiose 2-epimerase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139: 1002–1008.
- [25] Chen QM, Zhang WL, Zhang T, Jiang B, Mu WM. Characterization of an epilactose-producing cellobiose 2-epimerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 116: 39–44.
- [26] Ito S, Hamada S, Yamaguchi K, Umene S, Ito H, Matsui H, Ozawa T, Taguchi H, Watanabe J, Wasaki J, Ito S. Cloning and sequencing of the cellobiose 2-epimerase gene from an obligatory anaerobe, *Ruminococcus albus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 360(3): 640–645.
- [27] Ito S, Taguchi H, Hamada S, Kawauchi S, Ito H, Senoura T, Watanabe J, Nishimukai M, Ito S, Matsui H. Enzymatic properties of cellobiose 2-epimerase from *Ruminococcus albus* and the synthesis of rare oligosaccharides by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(3): 433–441.
- [28] Taguchi H, Senoura T, Hamada S, Matsui H, Kobayashi Y, Watanabe J, Wasaki J, Ito S. Cloning and sequencing of the gene for cellobiose 2-epimerase from a ruminal strain of *Eubacterium cellulosolvens*. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 287(1): 34–40.
- [29] Senoura T, Taguchi H, Ito S, Hamada S, Matsui H, Fukiya S, Yokota A, Watanabe J, Wasaki J, Ito S. Identification of the cellobiose 2-epimerase gene in the genome of *Bacteroides fragilis* NCTC 9343. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(2): 400–406.
- [30] Ojima T, Saburi W, Sato H, Yamamoto T, Mori H, Matsui H. Biochemical characterization of a thermophilic cellobiose 2-epimerase from a thermohalophilic bacterium, *Rhodothermus marinus* JCM9785. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75(11): 2162–2168.
- [31] Park CS, Kim JE, Lee SH, Kim YS, Kang LW, Oh DK. Characterization of a recombinant manno-2-epimerase from *Spirochaeta thermophila* that is suggested to be a cellobiose 2-epimerase. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(11): 1873–1880.
- [32] Ojima T, Saburi W, Yamamoto T, Mori H, Matsui H. Identification and characterization of cellobiose 2-epimerases from various aerobes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(1): 189–193.
- [33] Tyler TR, Leatherwood JM. Epimerization of disaccharides by enzyme preparations from *Ruminococcus albus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1967, 119: 363–367.
- [34] Park CS, Kim JE, Choi JG, Oh DK. Characterization of a recombinant cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and its application in the production of mannose from glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(6): 1187–1196.
- [35] Hunziker OF, Nissen BH. Lactose solubility and lactose crystal formation: I. Lactose solubility. *Journal of Dairy Science*, 1926, 9(6): 517–537.
- [36] Park AR, Kim JS, Jang SW, Park YG, Koo BS, Lee HC. Rational modification of substrate binding site by structure-based engineering of a cellobiose 2-epimerase in *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 224.
- [37] Dendene K, Guihard L, Balanec B, Bariou B. Study of the separation of lactose, lactulose and galactose by liquid chromatography using cationic ion-exchange resin columns. *Chromatographia*, 1995, 41(5/6): 561–567.
- [38] Kim YS, Kim JE, Oh DK. Borate enhances the production of lactulose from lactose by cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 809–812.
- [39] Lim BC, Kim HJ, Oh DK. High production of D-tagatose by the addition of boric acid. *Biotechnology Progress*, 2007, 23(4): 824–828.
- [40] Shen QY, Zhang YZ, Yang RJ, Pan SY, Dong J, Fan YT, Han L. Enhancement of isomerization activity and lactulose production of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Food Chemistry*, 2016, 207: 60–67.
- [41] Gu JY, Yang RJ, Hua X, Zhang WB, Zhao W. Adsorption-based immobilization of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* cellobiose 2-epimerase on *Bacillus subtilis*

- spores. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, 62(2): 237–244.
- [42] Wang MM, Hua X, Yang RJ, Shen QY. Immobilization of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on commercial resin Duolite A568. *Food Bioscience*, 2016, 14: 47–53.
- [43] Wang MM, Yang RJ, Hua X, Shen QY, Zhang WB, Zhao W. Lactulose production from lactose by recombinant cellobiose 2-epimerase in permeabilised *Escherichia coli* cells. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015, 50(7): 1625–1631.
- [44] Kuschel B, Seitzl I, Glu \square ck C, Mu WM, Jiang B, Stressler T, Fischer L. Hidden reaction: mesophilic cellobiose 2-epimerases produce lactulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(12): 2530–2539.
- [45] Rentschler E, Schuh K, Krewinkel M, Baur C, Claaßen W, Meyer S, Kuschel B, Stressler T, Fischer L. Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(10): 6767–6775.
- [46] Manjasetty BA, Chance MR. Crystal structure of *Escherichia coli* L-arabinose isomerase (ECAI), the putative target of biological tagatose production. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 360(2): 297–309.
- [47] Yoshida H, Yamada M, Nishitani T, Takada G, Izumori K, Kamitori S. Crystal structures of d-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii* and its complexes with d-tagatose and d-fructose. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374(2): 443–453.
- [48] Yoshida H, Yamada M, Ohyama Y, Takada G, Izumori K, Kamitori S. The structures of L-rhamnose isomerase from *Pseudomonas stutzeri* in complexes with L-rhamnose and D-allose provide insights into broad substrate specificity. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 365(5): 1505–1516.
- [49] Whitlow M, Howard AJ, Finzel BC, Poulos TL, Winborne E, Gilliland GL. A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 Å *Streptomyces rubiginosus* structure with xylitol and D-xylose. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1991, 9(3): 153–173.
- [50] Saburi W. Functions, structures, and applications of cellobiose 2-epimerase and glycoside hydrolase family 130 mannoside phosphorylases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(7): 1294–1305.
- [51] Fujiwara T, Saburi W, Matsui H, Mori H, Yao M. Structural insights into the epimerization of β -1,4-linked oligosaccharides catalyzed by cellobiose 2-epimerase, the sole enzyme epimerizing non-anomeric hydroxyl groups of unmodified sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(6): 3405–3415.
- [52] Fujiwara T, Saburi W, Inoue S, Mori H, Matsui H, Tanaka I, Yao M. Crystal structure of *Ruminococcus albus* cellobiose 2-epimerase: structural insights into epimerization of unmodified sugar. *FEBS Letters*, 2013, 587(7): 840–846.
- [53] Mu WM, Li QX, Fan C, Zhou C, Jiang B. Recent advances on physiological functions and biotechnological production of epilactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(5): 1821–1827.
- [54] Nishimukai M, Watanabe J, Taguchi H, Senoura T, Hamada S, Matsui H, Yamamoto T, Wasaki J, Hara H, Ito S. Effects of epilactose on calcium absorption and serum lipid metabolism in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(21): 10340–10345.
- [55] Watanabe J, Nishimukai M, Taguchi H, Senoura T, Hamada S, Matsui H, Yamamoto T, Wasaki J, Hara H, Ito S. Prebiotic properties of epilactose. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(12): 4518–4526.
- [56] Suzuki T, Nishimukai M, Shinoki A, Taguchi H, Fukiya S, Yokota A, Saburi W, Yamamoto T, Hara H, Matsui H. Ingestion of epilactose, a non-digestible disaccharide, improves postgastrectomy osteopenia and anemia in rats through the promotion of intestinal calcium and iron absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(19): 10787–10792.
- [57] Ito S, Hamada S, Ito H, Matsui H, Ozawa T, Taguchi H, Ito S. Site-directed mutagenesis of possible catalytic residues of cellobiose 2-epimerase from *Ruminococcus albus*. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(7): 1065–1071.
- [58] Shen QY, Zhang YZ, Yang RJ, Hua X, Zhang WB, 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.
- [59] Han L, Yang RJ, Zhao W, Shen QY, Zhang WB, Hua X. Expression of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in *Pichia pastoris* and its enzymatic characterization. *Industrial Microbiology*, 2016, 46(1): 16–21. (in Chinese)
- 韩亮, 杨瑞金, 赵伟, 沈秋云, 张文斌, 华霄. 纤维二糖差向异构酶在毕赤酵母中的表达及酶学性质研究. *工业微生物*, 2016, 46(1): 16–21.

- [60] Wang XM, Zhang K, Chen S, Wu J. Recombinant expression and fermentation optimization of *Dictyoglomus thermophilum* cellobiose 2-epimerase in *Bacillus subtilis*. *China Biotechnology*, 2019, 39(7): 24–31. (in Chinese)
王鑫森, 张康, 陈晟, 吴敬. 嗜热网球菌纤维二糖差向异构酶在枯草芽孢杆菌中的表达及发酵优化. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(7): 24–31.
- [61] Wu L T, Xu C, Li S, Liang JF, 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.
- [62] Wu JY, Jiang PX, Chen W, Xiong DD, Huang LL, Jia JY, Chen YY, Jin JM, Tang SY. Design and application of a lactulose biosensor. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45994.

Advances in bio-production of lactulose using cellobiose 2-epimerases

Zheng Xu^{1*}, Qian Zhang², Kewen Li², Hong Xu¹

¹ State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu Province, China

² Baolingbao Biology Co., Ltd., Yucheng 251200, Shandong Province, China

Abstract: Lactulose, a reducing disaccharide, is composed of D-galactosyl and D-fructosyl moieties via the ligation of a β -1,4 glycosidic bond. The concentrated lactulose solution can be used to treat chronic constipation and hepatic encephalopathy. It is an over-the-counter drug (OTC) worldwide, resulting in a massive requirement for its production. Lactulose is also a prebiotic that benefits human intestinal flora. Current industrial production of lactulose relies on chemical catalysis, with harmful catalyst and difficult in the down-stream processing. Recently, cellobiose 2-epimerase (CE) is recognized as an efficient biocatalyst for lactulose production using lactose as the substrate. This technique is environmentally friendly and composed of simpler procedures, showing promising future for an industrial application. This paper reviews recent developments in CE enzyme research, and the biotechnological route of lactulose synthesis.

Keywords: lactulose, cellobiose 2-epimerase, biocatalysis, prebiotics, constipation, hepatic encephalopathy

(本文责编: 李磊)

Supported by the Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (NY-056) and by the Taishan Industry Leader Talent Project

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-58139433; E-mail: xuzheng@njtech.edu.cn

Received: 26 March 2020; Revised: 20 May 2020; Published online: 24 July 2020