

## 총 설

# 젖당(Lactose)으로부터 락툴로오스(Lactulose) 생산을 위한 연구 동향

이지현\*<sup>‡</sup> · 유하영\*<sup>‡</sup> · 정다운\* · 박찬호\* · 송윤석\*\* · 박철환\*\*\* · 김승욱\*<sup>†</sup>

\*고려대학교 화공생명공학과  
136-713 서울시 성북구 안암로 145  
\*\*전라북도 생물산업진흥원 연구개발팀  
561-360 전주시 덕진구 혁신로 399  
\*\*\*광운대학교 화학공학과  
139-701 서울시 노원구 광운로 20

(2014년 1월 24일 접수, 2014년 2월 25일 수정본 접수, 2014년 3월 3일 채택)

## Research Trend of Lactulose Production from Lactose

Ja Hyun Lee\*<sup>‡</sup>, Hah Young Yoo\*<sup>‡</sup>, Da Un Jung\*, Charnho Park\*, Yoon Seok Song\*\*,  
Chulhwan Park\*\*\* and Seung Wook Kim\*<sup>†</sup>

\*Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, 145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 136-701, Korea  
\*\*Production Support Team, Jeonbuk Institute for Bioindustry, 399 Hyuksin-ro, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-360, Korea  
\*\*\*Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, 20 Gwangun-ro, Nowon-gu, Seoul 139-701, Korea  
(Received 24 January 2014; Received in revised form 25 February 2014; accepted 3 March 2014)

## 요 약

락툴로오스는 식품과 제약분야에서 기능성 성분으로 알려져 있으며, 산업적으로 많이 활용되고 있어 주목을 받고 있다. 식품분야에서는 정장작용을 위한 비피더스 인자, 제약분야에서는 주로 변비, 간성뇌증, 간질환의 합병증 그리고 혈액 내 포도당(glucose)과 인슐린 수치의 유지 등을 위하여 이용되고 있다. 락툴로오스 합성은 크게 화학적, 생물학적 방법으로 분류할 수 있으며, 화학적 방법에서는 젖당(lactose)의 알칼리 이성질체화법에 의하여 합성되지만, 생성물의 분해 및 다양한 부반응에 의한 정제의 난점과 폐기물 관리 등의 문제점들을 가지고 있다. 이러한 문제점들을 해결하고자, 효소를 이용한 합성 방법이 최근 연구되고 있다. 베타-갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase)는 젖당의 가수분해물 생산이 가능하기에 유제품 산업에서 매우 중요한 효소이며, 과당(fructose)으로 갈락토실(galactosyl) 잔기의 전달반응에 의하여 젖당으로부터 락툴로오스를 합성할 수 있다. 그러나 정제된 젖당은 매우 고가의 물질로써 락툴로오스를 합성하기에는 경제적으로 적합하지 않다. 본 총설에서는 락툴로오스를 합성하기 위한 화학적, 생물학적 공정에 대한 연구 동향을 간략하게 소개하고, 저가의 기질을 활용한 경제적인 락툴로오스 생산에 대한 연구 및 전망을 제시하고자 한다.

**Abstract** – Lactulose is well known for functional component in the food and pharmaceutical field and utilized in a wide variety of foods as a bifidus factor or functional ingredient for intestinal regulation. Lactulose synthesis can be classified into chemical and biological methods. In chemical methods, lactulose is synthesized by alkaline isomerization, but it has many disadvantages such as including product purification, lactulose degradation, side reactions and waste management. Therefore, the enzymatic synthesis methods were recently studied to solve these problems.  $\beta$ -galactosidase is a important enzyme in the dairy industry, because of the production of lactose-hydrolyzed products. Also,  $\beta$ -galactosidases can be utilized to synthesize lactulose from lactose by a trans-galactosylation reaction, using fructose as a galactosyl acceptor. However, the synthesis of lactulose from lactose is economically not suitable due to high levels of lactose price. This review summarizes the current state of lactulose production by chemical and biological processes.

Key words: Lactulose, Whey, Lactose, Functional Component, Enzymatic Synthesis

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: kimsw@korea.ac.kr

<sup>‡</sup>Ja Hyun Lee and Hah Young Yoo contributed equally to this work.  
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서 론

전 세계 인구의 상당수는 다양한 유형의 위장질환을 앓고 있다. 이러한 질병은 주로 인간의 장 내부로 병원성 균이 침입함으로써 발생된다. 일반적으로 인간은 생후 일주일 내에 건강 유지의 중요한 역할을 하는 비피더스균(*bifidobacteria*; 장내에 초산을 생산해 pH를 낮춰 병원성 세균이 장벽에 붙어 번식하는 것을 억제하는 정균 작용을 함)이 장 내부에 대량 서식하게 된다. 태아의 성장 과정 중 섭취하게 되는 영양체제는 모유에서 일반적인 음식으로 바뀌게 되는데 이때, 병원성 균을 포함한 다양한 균들이 장내로 잠입하게 되고, 여러 유형의 위장 질환의 원인이 된다. 이와 같은 질병의 문제를 해결하기 위해 낙농업을 비롯한 식품산업에서는 락토바실러스균(*lactobacillus acidophilus*, *lactobacillus casei*, *lactobacillus bulgaricus*, etc.)과 비피더스균(*bifidobacteria bifidum*, *bifidobacteria longum*, *bifidobacteria infantilis*, *bifidobacteria adolescentis*)을 이용하여 풍부한 생물학적 유제품을 개발하고 있다[1-5].

이러한 유제품을 섭취함에도 불구하고 효과적으로 해결되지 못하는 이유는 다음과 같이 정리할 수 있다. (1) 유제품 생산 과정에서 발생하게 되는 박테리아 균의 손실, (2) 섭취 후 장내로 발생하는 균의 총수 감소(박테리아 균은 pH가 5.5 이하에서 사멸하게 되는데 인간의 위는 pH가 약 1.5), (3) 담즙에 의한 살균작용 등이 있다[6-8]. 이러한 문제를 극복하기 위하여 1987년 Mizota가 장내에 존재하는 비피더스균을 내부적으로 자극시켜 군락을 형성에 도움이 되도록 하는 방안을 제시하였다. 이 방법은 비피더스 인자의 기능을 함유하고 있는 식품 성분을 사용하는 것으로 보통 프리바이오틱스(*prebiotics*)로 알려져 있다. 비피더스 인자 성분은 비피더스균의 성장을 자극시키는데, 락툴로오스(*lactulose*)는 이러한 성분들 중 하나이다[13-20].

Fig. 1을 보면 락툴로오스(4-O-β-D-galactopyranosyl-D-fructofuranose)는 과당(*fructose*)과 갈락토오스(*galactose*)의 β-1,4-glycosidic 결합에 의한 이당 분자로 구성된 합성 이당류이다. 특징적으로 인간의 소장 기관에 있는 비피도박테리움(*bifidobacterium*)의 모든 종에 이용된다. 대장에 있는 박테리아들은 대사를 위해 고유 영양원들과 락툴로오스를 필요로 하는데, 대사산물로 락트산, 아세트산, 포름산 등과 탄산가스를 생성한다. 이렇게 생성된 산은 생화학적으로 장에 있는 대변을 부드럽게 하는 작용을 하기때문에, 의약산업에서는 이를 응용한 급성 및 만성 변비치료제로써 락툴로오스를 사용한다[12,18].

비피더스 인자 중 하나인 락툴로오스는 장내 균 조절을 담당하는 기능성 성분으로써 식품에 다양하게 적용되며, 음식의 맛과 물리 화학적 특성에 유용한 변형을 제공할 뿐만 아니라, 소비자의 건강에

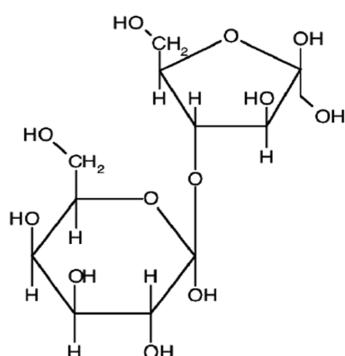


Fig. 1. Chemical structure of lactulose.

도움이 되는 특성을 갖는다. 또한, 맛을 강화하는 속성이 있고 물에 잘 용해되는 특성을 가지고 있어, 당뇨병 환자의 감미료, 다이어트 및 기능성 식품, 음료, 분유, 베이커리, 유제품 등 다양한 분야에서 사용되고 있다[18,20-22].

락툴로오스에 대한 잠재적인 성장과 관심이 최근 몇 년 동안 꾸준히 증가하였고, 수요의 증가로 인한 연간 생산량 역시 증가하고 있다. 1995년 기준 락툴로오스의 연간 글로벌 생산량은 20,000 톤으로 추정되며, 2004년은 40,000 톤, 2009년은 45,000 톤으로 증가하였다 [25].

현재, 락툴로오스는 주로 화학적 합성 방법으로 생산되고 있으나, 생성물의 분해로 인한 수율 저하와 부생성물에 의한 정제의 난점 등의 문제점이 있어, 최근에는 효소를 이용한 합성방법이 연구되고 있다. 또한 생산단가를 낮추기 위하여 저가의 원료를 활용하는 방안이 제안되고 있는데, 그 중 유장(*whey*)은 치즈, 탈지유 등 유제품 가공업의 부산물로서 거의 폐기되고 있는 실정이며, 락툴로오스를 생산하기 위한 원료로 대체 사용이 가능하다. 매년 전 세계적으로 약 7천 2백만 톤(*ton*)의 유장이 생산되고 있으나, 그 중 일부분인 20만 톤은 우유 단백질로 120만 톤은 젖당으로 전환되어 사용된다. 최근 유장과 일부 고체부분의 사용이 급증함에도 불구하고, 아직 그 일부만이 인간의 영양분 또는 동물의 사료 등으로 전환되어 활용하고 있는 실정이다[46-49].

본 총설에서는 락툴로오스를 합성하는 화학적, 생물학적 공정에 대한 연구 동향을 간략하게 소개하고, 경제적인 락툴로오스 생산을 위해 저가의 원료인 유장을 활용한 합성방법에 대한 연구와 락툴로오스 활용방법 그리고 전망에 대하여 집중 조명하였다.

## 2. 락툴로오스의 생산

락툴로오스는 젖당(*lactose*)의 포도당(*glucose*) 부분이 이성질화하여 과당(*fructose*)으로 대체되면서 생성된다(Fig. 2). 다수의 알칼리성 시약은 락툴로오스 생성을 위한 젖당 이성화 촉매로써 사용될 수 있다. 촉매는 중간 공정에서 제거되기 쉬워야 하며, 저렴한 비용, 환경친화성, 안전성 및 비 독성의 속성을 가져야 한다. 락툴로오스 생산을 위한 촉매 반응은 크게 화학적인 방법과 효소적인 방법으로 나뉜다.

### 2-1. 락툴로오스의 화학적 합성 방법

일반적으로 화학적 방법에 의한 락툴로오스의 생산은 젖당에 알칼리 용액을 촉매로 사용하여 생산한다. Fig. 3은 합성반응 메커니즘을 나타낸 것으로 젖당의 포도당 부분이 이성질화되어 감소하고, 과당으로 대체되면서 락툴로오스를 생산하게 된다[51].

현재, 락툴로오스의 생산은 주로 화학적 촉매인 알칼리 처리에 의한 에피머 반응(*epimerization*)을 이용한다. 상기 화학적 합성방법은 반응산물인 락툴로오스의 생산을 빠르지만 이외에 다양한 부산물의 생성으로 인하여 의약품 및 특별한 목적의 식품으로 적용 시, 고가의 다단계 정제공정이 수반되어야 하고, 고온고압의 반응 조건 때문

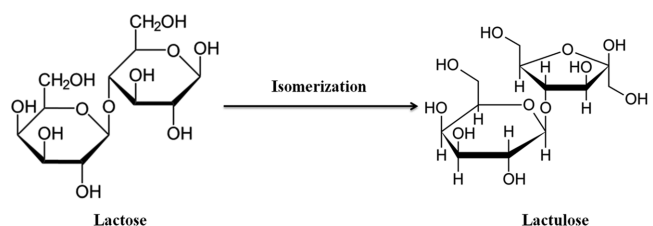


Fig. 2. Schematic isomerization process of lactulose formation.

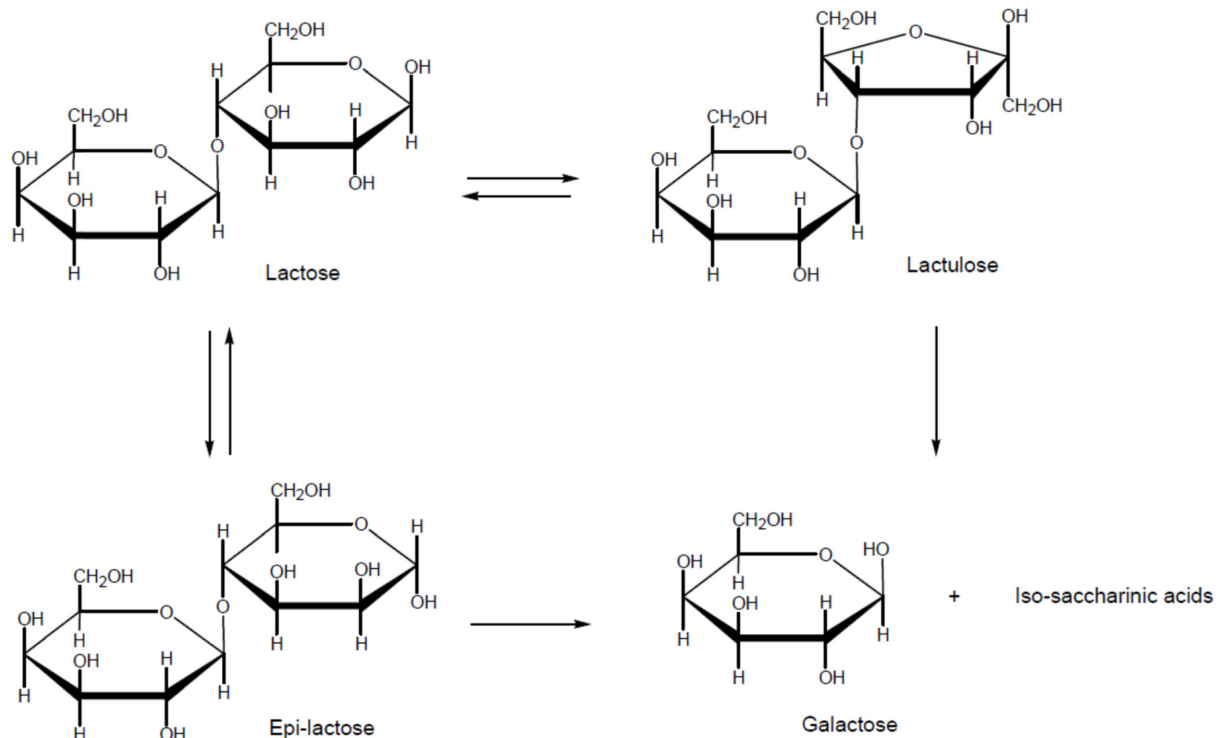


Fig. 3. Alkaline isomerization of lactose.

에 위험성이 높고, 화학촉매와 유기용매의 사용으로 인한 환경 정화 비용이 추가적으로 발생할 수 있다.

#### 2-1-1. 수산화나트륨, 수산화칼륨에 의한 합성

초기에는 수산화나트륨, 수산화칼륨 등의 단순 염기를 촉매로 사용하였다. 락툴로오스는 젖당과 석회의 혼합용액을 35 °C의 온도에서 가열하여 생산하였다[26]. 이 후, 결정구조의 락툴로오스를 얻기 위하여 황산, 탄산칼슘 에탄올, 메탄올, 에테르, 황성탄, 그리고 브로민 등의 시약을 사용하여 분리 및 정제 공정을 수행하였다. 수산화칼륨을 촉매로 사용하였을 경우 60%의 젖당 용액과 0.1%의 수산화칼륨의 혼합용액을 100~102 °C에서 15분간 반응시키고, 전기분해와 이온교환수지를 이용하여 분리하였다. 그리고 수산화나트륨, 수산화마그네슘, 산화 규 아민류 등의 알칼리 시약을 사용하여 젖당으로부터 락툴로오스를 얻을 수 있다[27-32].

#### 2-1-2. 황산염과 인산염에 의한 합성

황산염(sulphites) 및 인산염(phosphates)은 이당류의 산화를 방지할 수 있는 특성이 있기 때문에 상대적으로 높은 반응 온도와 고농도의 젖당을 사용하게 된다. 락툴로오스 생산을 위해 60~65% 농도의 젖당이 사용되고, 온도 범위는 80~100 °C이다. 그 후, 젖당과 락툴로오스 용액은 황산염과 유기산으로부터의 분리 및 정제를 위해 이온교환 수지를 사용하여 처리하였다[33].

#### 2-1-3. 알루미늄이트와 붕산염에 의한 합성

알루미늄이트(aluminates) 및 붕산염(borates)과 같은 양쪽성 전해질을 사용하는 경우 총 70~80% 이성질화가 증가될 수 있다[34,44]. 하지만 이 공정은 분리 공정의 비용이 많이 들어가기 때문에 산업적으로 활용하기 힘든 단점이 있다[30,35,36].

#### 2-1-4. 세피올라이트에 의한 합성

세피올라이트(sepiolite)는 마그네슘 규산염광물로서  $Mg^{2+}$  이온을 함유하고 있기 때문에 락토오스 이성질화 반응에 불균일 촉매(heterogeneous catalyst)로 사용이 가능하다. 하지만 이온 함량이 낮아 락툴로오스 합성 시 반응속도가 느리고 수율이 떨어지는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 다른 강한 알칼리 이온( $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ )으로 치환하여 촉매 효율을 높이는 연구가 알려져 있다. 앞서 언급하였듯이, 락툴로오스 합성 후 화학촉매와 유기용매를 비롯한 부산물들을 제거하기 위하여 이온교환 수지(resin)에 의한 분리 및 정제 단계를 필요로 한다. 음이온 교환 수지는 반응용액과 수지 사이의 수산화 이온( $OH^-$ )을 교환하여 락툴로오스 생산을 위한 젖당의 이성질체화 반응을 강화시키는데 사용되었다. 결국, 음이온 교환 수지는 수산화 이온 교환을 이용하여 젖당에서 락툴로오스로 이성질화하고, 최종 물질의 부산물 제거를 위해 동일한 레진을 사용하여 락툴로오스 생산 과정을 단순화시키기 위하여 사용되어왔다.

다른 방법들과 비교하여 장점은 이성화 공정을 위한 촉매 및 부산물 제거 단계, 최종 물질의 염료로부터의 정제가 필요하지 않다. 또한, 이 기술에 의해 생산된 락툴로오스는 순도가 높기 때문에 아이들을 위한 기능성 식품과 비피더스균을 포함하는 전문 식품에 사용할 수 있다[37].

#### 2-2. 락툴로오스의 효소적 합성 방법

락툴로오스의 효소 합성은 일반적으로  $\beta$ -갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase) 효소를 이용한다.  $\beta$ -갈락토시다아제(EC.3.2.1.23)는 trans-galactosylation 반응과 갈락토올리고당(galacto-oligosaccharides) 등의 젖당계 유도체의 합성을 위해 잘 알려진 생체 촉매이다[38,39]. 락툴로오스는 효소적으로 젖당의 이당류를  $\beta$ -갈락토시다아제를 이용하여 단당류로 전환시키며, 이에 갈락토스와 과당의 결합에 의해

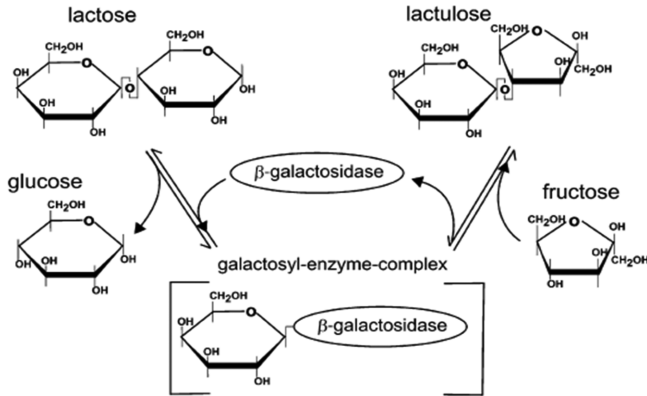


Fig. 4. Overview of enzymatic process for conversion of lactose to lactulose.

생성된다(Fig. 4). 가장 눈에 띄는 반응은 특정 이성화 효소에 의해 젖당에서 직접 이성화되어 락툴로오스를 생성하는 것이다. 또한, 효소를 이용한 생물전환 합성방법은 반응에 있어 고도의 정밀성, 특이성, 선택성을 지니고, 소규모의 장치로도 생산이 가능하며, 환경 친화적이라는 장점을 가진다.

#### 2-2-1. β-갈락토시다아제에 의한 합성

효소적인 락툴로오스 생산 방법은 *Aspergillus oryzae*로부터 생성된 β-갈락토시다아제와 *Pyrococcus furiosus*로부터 생성된 hyperthermostable β-glycosidase를 사용하여 trans-galactosylation을 통해 생성된다. 락툴로오스는 β-갈락토시다아제를 사용하면 30 mmol L<sup>-1</sup>(젖당 기준 30%)과 β-glycosidase는 46 mmol L<sup>-1</sup>(젖당 기준 44%) 생산된다[40]. 또한, *Sulfolobus solfataricus*로부터 내열성 β-갈락토시다아제를 생산하는 유전자를 조작하여 클로닝하고, *Escherichia coli*에서 발현시켜 락툴로오스를 생산한다. β-갈락토시다아제에 의한 trans-galactosylation 반응은 젖당의 갈락토스 공여체와 수용체인 과당으로부터 락툴로오스가 생성된다[41]. 효소적인 방법을 이용한 유장 투과액으로부터 제조된 갈락토올리고당의 락툴로오스 합성은 젖당과 과당의 비율 및 기질의 농도에 영향을 받는다[42].

#### 2-2-2. 고정화된 효소에 의한 합성

2010년 Jiang 연구진은 젖당과 과당을 원료로 사용하여 dual-enzymatic 방법을 통해 락툴로오스 합성에 성공하였다. 이 dual-enzymatic 방법은 젖당 분해효소와 포도당 이성질화 효소를 고정화하여 사용한다. 젖당 분해효소의 고정화 방법은 magnetic microspheres와 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan 안에 젖당 분해효소를 녹여 가교법으로 고정화하는 것이다[43].

다른 예로는 정제된 젖당이 아닌 유장으로부터 락툴로오스를 합성하기 위하여 β-galactosidase와 포도당 이성화효소(glucose isomerase)를 실리카겔에 고정화하여 사용하였다. 젖당 또는 자일로오스(xylose)를 이용한 효소들의 전처리(pretreatment)는 고정화 후에 베타-갈락토시다아제와 포도당 이성화효소의 활성을 각각 2.6배, 2.5배 증가시켰다. 50 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.5)에 20%(w/v)의 젖당과 과당, 12 U/ml의 고정화 효소를 첨가하여 47°C에서 반응을 수행하였을 때, 락툴로오스는 10.95 g/L 합성되었다[45-47]. 락툴로오스의 연속적 합성은 효소 마이크로반응기(enzyme microreactor)와 충전상 반응기

(packed-bed reactor)에서 수행되었다. 각각의 최적유속에서 운전되었을 때, 효소 마이크로반응기에서는 1.42 g/L 그리고 충전상 반응기에서는 19.13 g/L의 락툴로오스가 합성되었다[48].

β-글리코시다아제의 높은 가격은 효소적 방법의 상용화에 큰 걸림돌이 되기 때문에 고정화를 통한 효소의 재사용을 통해 생산 단가를 절감시킬 수 있다. 또한, 앞서 언급한 낙농업의 폐자원인 유장(whey)을 생산 원료로 사용함으로써 락툴로오스 생산 단가를 낮출 수 있을 것으로 기대된다.

### 3. 락툴로오스의 활용

락툴로오스는 식품 및 제약 산업에 많이 이용된다. 식품 분야에서의 락툴로오스는 비피더스 인자로 장내 조절 기능성 성분으로서 다양하게 적용되며, 당뇨병 환자의 감미료, 제과 제품, 음료, 유아 분유, 베이커리 제품, 요구르트, 유제품 디저트의 설탕 대신 사용할 수 있다[18,21,22]. 또한, 맛을 강화하는 속성, 음식의 갈색 착색제, 물 등에 잘 용해되는 특성을 가지고 있다[23].

제약 분야에서 락툴로오스는 변비 치료, 간성 뇌증, 간 질환의 합병증, 살모넬라 담체, 중양의 예방, 면역학, 항-독소 효과, 혈당 및 인슐린 수준을 유지하기 위해 주로 사용된다. 특히 변비 치료에 성공적인 생리학적인 치료제이며, 유아에서 노인까지 모든 연령에서 사용하고 있다[48-50].

### 4. 결 론

락툴로오스의 생산은 화학적·효소적 방법과 분리 및 정제 조건에 의해 영향을 받는 복잡한 공정이다. 화학적 방법의 경우, 락툴로오스는 젖당의 알칼리 이성질화법에 의하여 합성되지만, 생성물의 분해 및 다양한 부반응에 의해 정제의 난점과 폐기물 처리 등의 문제로 공정 비용이 증가하는 문제점을 갖고 있다. 그러나 이러한 문제점은 효소적 촉매의 사용과 정제된 젖당이 아닌 낙농업의 폐기물로 대체함으로써 원료 단가를 최소화하여 공정 비용을 절감할 수 있다. 특히, 치즈 제조의 부산물인 유장은 고농도의 락툴로오스를 함유한 저가의 물질이기에 이를 이용할 경우 락툴로오스 생산에 있어 원료비 측면에서 50% 이상의 원료비 저감효과를 기대할 수 있다. 아직까지 효소적 방법에 의한 락툴로오스 생산의 상용화는 높은 효소 가격으로 인하여 힘들겠지만 좀 더 연구가 보완되어 활성과 안정성이 향상된 효소 고정화 기술 도입과 반응 규모를 확대할 수 있다면, 부반응이 없고 오염물질을 발생시키지 않는 환경 친화적이고 경제적인 공정의 가능성과 낙농업 폐기물인 유장의 활용이라는 측면에서 새로운 시장을 형성할 수 있다.

### 감 사

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원(309016-5)과 교육과학기술부 글로벌프론티어사업 차세대바이오메스사업단(ABC-2011-0031360)의 지원을 받아 수행하였습니다.

### References

- Clark, P. A. and Martin, J. H., "Selection of Bifidobacteria for Use as Dietary Adjuncts in Cultured Dairy Foods: III e Toler-

- ance to Simulated Bile Concentrations of Human Small Intestines," *Cultured Dairy Product Journal*, **29**, 18(1994).
2. Donkorm, O. N., Nilmini, S. L. K., Stolic, P., Vasiljevic, T. and Shah, N. P., "Survival and Activity of Selected Probiotic Organisms in Settype Yoghurt During Cold StorageInt," *Int. Dairy. J.*, **17**, 657(2007).
  3. Ninonuevo, M. R., Ward, R. E., LoCascio, R. G., German, J. B., Freeman, S. L., Barboza, M., Mills, D. A. and Lebrilla, C. B., "Methods for the Quantitation of Human Milk Oligosaccharides in Bacterial Fermentation by Mass Spectrometry," *Anal. Biochem.*, **361**, 15(2007).
  4. Olguin, F., Araya, M., Hirsch, Sl., Brunser, O., Ayala, B., Rivera, R. and Gotteland, M., "Prebiotic Ingestion Does Not Improve Gastrointestinal Barrier Function in Burn Patients," *Burns*, **31**, 482(2005).
  5. Wainwright, L., "Does the Addition of Prebiotics to Infant Formula Have Beneficial Effects for the Baby," *J. Perinat. Neonatal Nurs.*, **12**, 130(2006).
  6. Chou, C. C. and Hou, W., "Growth of Bifidobacteria in Soymilk and Their Survival in the Fermented Soymilk Drink During Storage," *Int. J. Food Microbiol.*, **56**, 113(2000).
  7. Lankaputhra, W. E. V. and Shah, H. P., "Survival of Lactobacillus Acidophilus and Bifidobacterium spp. in the Presence of Acid and Bile Salts," *Cultured Dairy Product Journal*, **30**, 2(1995).
  8. Lian, W. C., Hsiao, H. C. and Chou, C. C., "Viability of Micro-encapsulated Bifidobacteria in Simulated Gastric Juice and Bile Solution," *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 293(2002).
  9. Bouhnik, Y., Flourie, B., Agay-Abensour, D., Pochart, L., Gramet, P. and Carrobi, R., "Process for Preparing Lactulose," *J. Dairy Sci.*, **52**, 300(1990).
  10. Delzenne, N. M., "Oligosaccharides: State of the Art," *P. Nutr. Soc.*, **62**, 177(2003).
  11. Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. and Cummings, J. H., "Selective Stimulation of Bifidobacteria in the Human Colon by Oligofructose and Inulin," *Gastroenterology*, **108**, 975(1995).
  12. Mizota, T., Tamura, Y., Tomita, M. and Okonogi, S., "Lactulose as a Sugar with Physiological Significance," *Inter. Dairy Federation*, **212**, 69(1987).
  13. Kaplan, H. and Hutkins, R. W., "Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria," *Appl. Environ. Microb.*, **66**, 2682(2000).
  14. Marteau, P. and Boutron-Ruault, M. C., "Nutritional Advantages of Probiotics and Prebiotics," *Brit. J. Nutr.*, **87**, S153(2002).
  15. Roberfroid, M. B., "Functional Foods: Concepts and Application to Inulin and Oligofructose," *Brit. J. Nutr.*, **87**, 139(2002).
  16. Saarela, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T. and Matto, J., "The Effect of Lactose Derivates Lactulose, Lactitol and Lactobionic Acid on the Functional and Technological Properties of Potentially Probiotic Lactobacillus Strains," *Int. Dairy J.*, **13**, 291(2003).
  17. Ziemer, C. J. and Gibson, G. R., "An Overview of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in the Functional Food Concept: Perspectives and Future Strategies," *Int. Dairy J.*, **8**, 473(1998).
  18. Tamura, Y., Mizota, T., Shimamura, S. and Tomita, M., "Lactulose and Its Application to the Food and Pharmaceutical Industries," *Inter. Dairy Federation*, **289**, 43(1993).
  19. Alander, M., Matto, J., Kneifel, W., Johansson, M., Ogler, B. and Crittenden, R., "Effect of Galacto-oligosaccharide Supplementation on Human Faecal Microflora and on Survival and Persistence of Bifidobacterium lactis Bb-12 in the Gastrointestinal Tract," *Int. Dairy J.*, **11**, 817(2001).
  20. Ballongue, J., Schumann, C. and Quignon, P., "Effects of Lactulose and Lactitol on Colonic Microflora and Enzymatic Activity," *Scand. J. Gastroentero.*, **32**, 41(1997).
  21. Crittenden, R. G. and Playne, M. J., "Production, Properties and Applications of Food-grade Oligosaccharides," *Trends food Sci. Tech.*, **7**, 353(1996).
  22. Strohmaier, W., "Strohmaier W. Lactulose: status of Health-related Applications," *Inter. Dairy Federation*, **9804**, 262(1998).
  23. Tabatabaie, F. and Mortazavi, A., "Influence of Lactulose on the Survival of Probiotic Strains in Yoghurt," *World. Appl. Sci. J.*, **3**, 88(2008).
  24. Kosaric, N. and Asher, Y., "Cheese Whey and Its Utilization," *Resour., Conserv. and Recy.*, **5**, 23(1982).
  25. Playne, M. J. and Crittenden, R. G., "Galacto-oligosaccharide and Other Products Derived from Lactose. In: McSweeney PLH, Fox PF, Editors. Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Major Constituents," 3<sup>rd</sup> Eds, **13**, 155(2009).
  26. Montgomery, E. M. and Hudson, C. S., "Relations Between Rotating Power and Structure in the Sugar Group. Synthesis of New Disaccharide Ketoses from Lactose," *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 101(1930).
  27. De Garr, W. T. and Pluim, H., "Method of Preparing Lactulose," European patent, 0, 339, 749(1991).
  28. Deya, E. and Takahashi, K., "Production Process of High Purity Lactulose Syrup," US Patent, 5, 034, 064(1991).
  29. Dendenem, K., Guihard, L., Nicolas, S. and Bariou B., "Kinetics of Lactose Isomerisation to Lactulose in Alkaline-medium," *J. Chem. Technol. Biot.*, **61**, 37(1994).
  30. Zokaee, F., Kaghzchi, T., Zare, A. and Soleimani, M., "Isomerization of Lactose to Lactulose-study and Comparison of Three Catalytic Systems," *Process Biochem.*, **37**, 629(2002).
  31. Carobbi, R., Miletto, S. and Franci, B., "Process for Preparing Lactulose from Lactose, in the form of a Syrup or a Crystalline Product," U.S. Patent, 4536221(1985).
  32. Parrish, F. W., "Isomerization of Glucose, Maltose, and Lactose with Amino Compounds," US Patent, 3, 514, 327(1970).
  33. Siegfried, M. and Ernst, N., "Method for Lactulose Concentrate Production," *Austria Patent*, **288**, 595(1969).
  34. Carobbi, R. and Innocenti, F., "Process for Preparing Lactulose from Lactose by Epimerization with Sodium Aluminate," US Patent, 4, 957, 564(1990).
  35. Carobbi, R. and Innocenti, F., "Process for Preparing Lactulose from Lactose by Epimerization with Sodium Aluminate," European patent, 0, 320, 670(1990).
  36. Krumbbloz, R. E. and Dorsheid, M. G., "Method of Manufacturing Lactulose," European patent, 0, 375, 040(1991).
  37. Miguel, A. F., Manuela, J., Daniel, R., Mar, V. and Agustin, O., "Isomerization of Lactose Catalyzed by Alkaline-Substituted Sepiolites," *Food Chemistry*, **66**, 301-306(1999).
  38. Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F. and Kumar, H., "Microbial Production, Immobilization and Applications of  $\beta$ -D-galactosidase," *J. Chem. Technol. Biot.*, **81**, 530(2006).
  39. Panesar, P. S., Kumari, S. and Panesar, R., "Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -galactosidase in Food Processing Industries," *Enzyme Res.*, 1(2010).

40. Mayer, J., Conrad, J., Klaiberm, I., Lutz-Wahl, S., Beifuss, U. and Fischer, L., "Enzymatic Production and Complete Nuclear Magnetic Resonance Assignment of the Sugar Lactulose," *J. Agr. Food Chem.*, **52**, 6983(2004).
41. Kim, Y. S., Park, C. S. and Oh, D. K., "Lactulose Production from Lactose and Fructose by a Thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*," *Enzyme Microb. Tech.*, **39**, 903(2006).
42. Adamczak, M., Charubin, D. and Bednarski, W., "Influence of Reaction Medium Composition on Enzymatic Synthesis of Galactooligosaccharides and Lactulose from Lactose Concentrates Prepared from Whey Permeate," *Chem. Pap.*, **6**, 111(2009).
43. Hua, X., Yang, R., Zhangm, W., Fie, Y., Jin, Z. and Jiang, B., "Dual-enzymatic Synthesis of Lactulose in Organic-aqueous Two-phase Media," *Food Res. Int.*, **43**, 716(2010).
44. Hichs, K., Raupp, D. and Smith, W., "Preparations and Purification of Lactulose from Sweet Cheese Whey Ultrafiltrate," *J. Agr. Food Chem.*, **32**, 288(1984).
45. Song, Y. S., Lee, H. U., Park, C. and Kim, S. W., "Batch and Continuous Synthesis of Lactulose from Whey Lactose by Immobilized  $\beta$ -galactosidase," *Food Chem.*, **136**, 689(2013).
46. Song, Y. S., Suh, Y. J., Park, C. and Kim, S. W., "Improvement of Lactulose Synthesis Through Optimization of Reaction Conditions with Immobilized  $\beta$ -galactosidase," *Korea J. Chem. Eng.*, **30**, 160(2013).
47. Song, Y. S., Lee, H. U., Park, C. and Kim, S. W., "Optimization of Lactulose Synthesis from Whey Lactose by Immobilized  $\beta$ -galactosidase and Glucose Isomerase," *Carbohydr. Res.*, **369**, 1(2013).
48. Song, Y. S., Shin, H. Y., Lee, J. Y., Park, C. and Kim, S. W., " $\beta$ -Galactosidase-immobilised Microreactor Fabricated Using a Novel Technique for Enzyme Immobilisation and Its Application for Continuous Synthesis of Lactulose," *Food Chem.*, **133**, 611(2012).
49. Foster, K. J., Lin, S. and Turck, C. J., "Current and Emerging Strategies for Treating Hepatic Encephalopathy," *Crit. Care. Nurs. Clin.*, **22**, 341(2010).
50. Paik, Y. H., Lee, K. S. and Han, K. H., "Comparison of Rifaximin and Lactulose for the Treatment of Hepatic Encephalopathy: a Prospective Randomized Study," *Yonsei Med. J.*, **46**, 399(2005).
51. Sharma, B. C., Sharma, P., Agrawal, A. and Sarin, S. K., "Secondary Prophylaxis of Hepatic Encephalopathy: an Open-label Randomized Controlled Trial of Lactulose Versus Placebo," *Gastroenterol.*, **137**, 885(2009).