植物乳杆菌 β-半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖及其体外乳酸菌增殖活性

张宏志，马艳弘，周剑忠，刘小莉

（江苏省农业科学院农产品加工研究所，江苏南京 210014）

摘要：利用植物乳杆菌来源的β-半乳糖苷酶合成低聚半乳糖（galactooligosaccharides，GOS），通过对乳糖浓度、反应温度、体系pH以及酶浓度等反应条件及其体外增殖乳酸菌（lactic acid bacteria，LAB）进行研究，确定酶法合成GOS及其各主要组分产量的最优条件并表征其益生功效。结果表明：乳糖浓度和反应温度的变化对于产物合成影响较大，为主要影响条件，而体系pH和酶浓度对于各产物最高产量的影响不显著，为次要影响条件。经过对反应条件进行优化，总产量与各组分产量的最优条件一致，为底物浓度400 g/L，体系pH 7.0，10 U/mL的酶浓度，45 ℃水浴10 h。总GOS产量达到177.26 g/L，在体系中占44.31%（*m/V*）。其中异乳糖、6′-半乳二糖、6′-GOS和3′-GOS的产量分别是63.22 g/L、15.32 g/L、72.21 g/L和25.11 g/L。相比较主要以β(1→4)糖苷键连接的商业化低聚半乳糖（QHT-GOS），半乳糖残基以β(1→6)糖苷键连接为主的新合成GOS对于供试LAB增殖作用更为显著，表现在以较低的低聚糖比例（44.3%）达到与之高比例低聚糖（70%）相当的LAB生长密度，以及具有明显优势的最大比生长速率。

关键词：酶法合成；低聚半乳糖；条件优化；增殖；体外

文章篇号：1673-9078(2020)06-161-171 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1258

Enzymatic Production and *Lactobacillus* Proliferation of Galactooligosaccharidesby *β*-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum in vitro*

ZHANG Hong-zhi, MA Yan-hong, ZHOU Jian-zhong, LIU Xiao-li

(Institute of Farm Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Absract: Enzymatic synthesis of prebiotic galactooligosaccharides (GOS) using the *β*-galactosidases produced from *Lactobacillus plantarum* was investigated. In this work, the effects of synthetic conditions including concentration of lactose substrate, reaction temperature, pH of system, enzyme concentration on the formation and the monitoring of the proliferation of lactic acid bacteria *in vitro*, total output and optimum conditions of different pure components of GOS were evaluated. Its probiotic activity was characterized. The results showed that the major reaction conditions were concentration of substrate, temperature, whereas pH and concentration of enzyme were secondary conditions. The optimal conditions for the total output was listed as followed: 45°C, substrate concentration of 400 g/L, pH 7.0, enzyme concentration of 10 U/mL, time of 10 h. Under these conditions, the total GOS output was 177.26 g/L, accounted for 44.31% (*m/V*) in the reaction system, including allo-lactose, 6′-galactobiose, 6′-GOS and 3′-GOS, they were 63.22 g/L, 15.32 g/L, 72.21 g/L and 25.11 g/L, respectively. For the proliferation of lactic acid bacteria *in vitro*, the new GOS was more remarkable by comparison to the commercialized GOS, as exhibited in the same amount of

引文格式：

张宏志,马艳弘,周剑忠,等.植物乳杆菌 β-半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖及其体外乳酸菌增殖活性[J].现代食品科技,2020,36(6):161-171

ZHANG Hong-zhi, MA Yan-hong, ZHOU Jian-zhong, et al. Enzymatic production and *Lactobacillus* proliferation of galactooligosaccharidesby *β*-galactosidase from *Lactobacillus plantarum in vitro* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 161-171

收稿日期：2019-12-20

基金项目：江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20150541)；江苏省农业科学院农产品加工研究所科研基金项目(JG(2017)06)

作者简介：张宏志（1985-），男，博士，副研究员，研究方向：食品微生物及生物技术；

通讯作者：刘小莉（1981-），女，博士，研究员，研究方向：食品微生物及生物技术

microbodies at relatively low concentration of GOS and the obvious advantage of maximum specific growth rate.

Key words: enzymatic synthesis; galactooligosaccharides (GOS); condition optimization; proliferation; in *vitro*

低聚半乳糖（GOS）是功能性低聚糖的一种，它是由 2~9 个半乳糖基与一个末端葡萄糖通过 *β*(1→3)、*β*(1→4)、*β*(1→6)糖苷键连接的结合糖[1]，其分子式为（Galactose）n-Glucose。GOS 是被普遍接受的益生元，它可以通过人的胃肠道不被消化降解而到达结肠，有选择性地刺激肠道内双歧杆菌和乳酸菌的生长和繁殖，从而促进人体的健康[2]。摄入 GOS 还可以抑制肠内有害微生物的生长和腐败物体的产生，有效地增强机体免疫力，降低癌症风险，促进矿物质吸收，调节血脂和胆固醇代谢，降低血压[3-5]。另外，GOS 一般水溶性较好，甜度是蔗糖的 0.3~0.6 倍，口感清爽，对酸热稳定，且具有抗龋齿活性，已被广泛应用于食品和医药等行业[6,7]。GOS 因其独特的生理功能和理化性质，一直备受健康人群青睐。

酶法合成是生产 GOS 是最有效的途径之一，主要是以乳糖为原料，利用酵母、霉菌和细菌等微生物来源的 *β*-半乳糖苷酶的转糖基活性获得产物[8,9]。GOS 是一个复杂的混合物，不同来源的 *β*-半乳糖苷酶直接影响着其结构和产率，而不同结构的 GOS 决定了其不同程度的益生特性[10-12]。作为最理性的益生菌之一，乳酸菌（LAB）是一种 *β*-半乳糖苷酶的优质来源。首先，LAB 是公认的安全性菌株，其生产的 *β*-半乳糖苷酶无需纯化即可直接用于食品级 GOS 的生产。其次，LAB 来源的 *β*-半乳糖苷酶合成的 GOS 多为 *β*(1→6)糖苷键连接的低聚糖，研究已证明该结构的低聚糖更容易被肠道益生菌所利用，具有更强的益生特性[12-16]。酶法合成 GOS 的产率受多种因素的影响，除了酶源，不同的工艺条件也是重要的因素。一般而言，较高的初始底物浓度有助于提高 GOS 的产率，较高的温度可以提高催化效率，而反应体系 pH 对其的影响则存在差异。

GOS 是一个复杂的化合物，其组成成分的化学结构（包括聚合度，单糖残基的类型和组成，糖苷键的构型和连接方式）与其独特生理功能和理化性质密切相关。明确 GOS 混合物具体组成成分及其化学结构是研究其各项功能的重要基础。体外研究表明，益生菌利用不同结构 GOS 作为碳源的生长特性表现显著地差异性[17-20]。根据不同结构 GOS 与不同益生功效的关系，对于有目的去选择和设计生产特定功效的 GOS 具有重要的意义。

本研究以乳糖为底物，利用源于 *L.plantarum* 70810 的 *β*-半乳糖苷酶纯酶酶法合成 GOS，通过对乳糖浓度、反应温度、pH 以及酶活浓度等关键反应条件的研究，确定最优反应条件；并以合成的 GOS 作为单一碳源，以乳糖和商品化 QHT-GOS 作为参照，对 4 株不同 LAB 进行纯培养，通过考察比较其体外增殖 LAB 的作用，为功能性低聚糖益生功效的评价提供一定的数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

β-半乳糖苷酶纯酶，由本研究室分离纯化自 *Lactobacillus. plantarum*70810[21]；

4 株不同来源和种类的 LAB，分别为分离自四川泡菜的植物乳杆菌（*L.plantarum*70810）和短乳杆菌（*L.brevis* D5-1），卫岗酸奶中的保加利亚乳杆菌（*L.bulgaricus* WG1-2），侗族酸肉中的鼠李糖乳杆菌（*L.rahamnosus* 6005），上述菌种均由本研究室分离并保存。

邻硝基苯-*β*-D-半乳糖苷(*o*NPG)、邻硝基苯酚（*o*NP）、六甲基二硅氮烷（HDMS）、三氟乙酸（TFA）均购自国药集团化学试剂有限公司；苯基-*β*-葡萄糖苷，Sigma 公司；商业化低聚半乳糖 QHT-GOS-600(GOS_{30})和 QHT-GOS-70S(GOS_{70})，江门量子高科生物股份有限公司；丙酮、葡萄糖、半乳糖、乳糖、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

THZ-98 型台式恒温振荡器，太仓市华美生化仪器厂；DJ300 型电子天平，常熟衡器工业公司；PB-20 型 pH 计，德国 Sartarius 公司；64RL 高速冷冻离心机，美国 Beckeman 公司；Powerdry LL3000 型冷冻干燥机，美国 Heto 公司；722S 可见分光光度计，上海精密科学仪器有限公司仪器；Agilent 6890N 型气相色谱仪，美国 Agilent 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶法合成低聚半乳糖

称取 1.0 g 乳糖置于 10 mL 离心管中，加入适量磷酸盐缓冲液（50 mmol/L，pH 6.5）调整溶液终浓度至 20 %（*m/V*），37 ℃水浴保温 30 min。将分离纯化得到的 *β*-半乳糖苷酶纯酶加入上述体系，使酶的终浓度为 10 U/mL。将上述溶液置于 37 ℃水浴中，在转

速为 200 r/min 的恒温摇床中震荡反应 10 h，沸水浴灭酶 5 min 以终止反应，取样 25 μL 稀释冻干。

1.3.2 低聚半乳糖的气相色谱法（GC）测定

样品衍生：称取冻干的低聚糖样品约 5 mg，加入 350 μL 2.5%氯化羟胺/吡啶溶液，75 ℃水浴 30 min；分别加入 350 μL 六甲基二硅氮烷和 35 μL 三氟乙酸，45 ℃水浴 30 min；反应混合物 8000 g 离心 5 min；取上清过 0.45 μm 有机滤膜，1 μL 注入 GC 分析。

色谱条件：色谱柱为 HP-5 毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；进样口和检测器温度分别是 300 ℃和 320 ℃；升温程序：200 ℃保持 15 min，以 3 ℃/min 升至 260 ℃，再以 1 ℃/min 升至 280 ℃，最后以 5 ℃/min 升至 310 ℃，保持 10 min；载气（N_2）流速：1.0 mL/min，进样量 1 μL；分流比 40:1。

定量方法（内标法）：以苯基-*β*-葡萄糖苷（0.2 mg/mL）作为内标，分别配制 0.02~2.0 mg/mL 浓度的（葡萄糖、半乳糖、乳糖、4'-半乳糖基乳糖）标准溶液，制作标准曲线，见表 1 所示。

表 1 糖的标准曲线回归方程及相关系数

Table 1 Regression equation and R^2 of standard sugars

组分	回归方程(y-峰面积，x-浓度，mg/mL)	相关系数(R^2)
葡萄糖	y=7.0314x+0.0677	0.9998
半乳糖	y=6.2508x+0.1829	0.9994
乳糖	y=5.1591x-0.0314	0.9981
4'-半乳糖基乳糖	y=3.1999x-0.1347	0.9955

1.3.3 酶法合成低聚半乳糖的条件优化

1.3.3.1 初始底物浓度对 GOS 合成的影响

分别称取一定量的乳糖置于 10 mL 离心管中，加入适量的磷酸盐缓冲液（50 mmol/L，pH 6.5）并适当加热使之溶解，调整溶液终浓度分别为 20、30、40、50%（*W/V*），37 ℃水浴保温 30 min。然后将来源于 *L. plantarum* 70810 的 *β*-半乳糖苷酶加入上述体系，使酶的终浓度为 10 U/mL。将上述溶液置于 37 ℃水浴中开始反应，于 0、2、4、6、8、10、12、14 h 隔时取样 25 μL，沸水浴灭酶 5 min 以终止反应，并将样品稀释冻干。衍生化处理后通过 GC 测定其中各产物的含量。每个样品，每个时间点均重复三次。

1.3.3.2 反应温度对 GOS 合成的影响

在 1.3.3.1 基础上，称取一定量的乳糖配制成初始底物浓度为 40%的乳糖缓冲溶液，考察不同反应温度（30、37、45、50 ℃）对酶法合成 GOS 合成的影响，其它条件和方法不变。

1.3.3.3 pH 对 GOS 合成的影响

在 1.3.3.2 基础上，考察不同 pH 缓冲溶液（pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5）对酶法合成 GOS 合成的影响，其它条件和方法不变。

1.3.3.4 酶浓度对 GOS 合成的影响

在 1.3.3.3 基础上，考察不同酶浓度（5、10、15、20 U/mL）对酶法合成 GOS 合成的影响，其它条件和方法不变。

1.3.4 低聚半乳糖体外增殖乳酸菌的研究

分别称取一定量的上述本试验合成的 GOS、以及商业化的 GOS_{30} 和 GOS_{70}（其中，30 和 70，分别代表 GOS 混合物中低聚半乳糖的含量为 30%和 70%），主要连接结构为 *β*(1-4)糖苷键置于试管中，无菌水溶解，0.22 μm 过滤；然后分别取代 MRS 培养基中的乳糖作为唯一碳源添加到无菌培养基中，并使终浓度为 2%。其它按正常配制，作为试验组。将乳糖做同样的处理，作为对照组。

将供试的 4 株乳酸菌接种于 MRS 培养基中，于 37 ℃恒温培养箱中培养 24 h，酶标仪测定细菌浓度，调整其浓度最大生长密度（OD_{600}）为 1.0。将活化好的乳酸菌以 2%的接种量，分别添加到试验组和对照组的无菌培养基中，混匀后移入无菌 96 孔板中，每孔 300 μL，于 37 ℃恒温培养箱中培养 48 h，每株乳酸菌做三个平行，不接种的培养基作为空白对照。每隔 1 h，采用多功能酶标仪准确测定发酵液 OD_{600}，连续测定 48 h。最后以时间为横坐标，OD_{600} 为纵坐标，绘制乳酸菌生长曲线，拟合曲线方程，根据拟合得到的模型参数（1），选用式（2）计算出最大比生长速率（μ_{max}）和式（3）计算出延滞期（lag）。

$$\mathrm{Lg}(N_t/N_0)=a\times\exp\{-\exp[-k\times(t-x_c)]\} \quad (1)$$

$$\mu_{max}=a\times k/e \quad (2)$$

$$\mathrm{lag}=x_c-1/k \quad (3)$$

式中，N_t、N_0 分别表示初始时间和在时间 t 时的微生物量（OD_{600}）；lag 为延滞期，h；a 为最大生物量 N_{max} 与初始生物量 N_0 的差值；x_c 为达到相对最大生长速率所需的时间，h；k 为在时间 x_c 的相对生长速率，OD_{600}/h。

1.4 数据处理

所有试验平行 3 次，实验数据采用 Origin Pro 8.6 软件进行数据分析并作图。

2 结果与分析

2.1 酶法合成低聚半乳糖的条件优化

酶源是决定 GOS 结构的最重要因素，不同微生物来源的 β-半乳糖苷酶以乳糖为底物，通过酶法合成的方式生产出了各种不同结构的 GOS，并表现出了一定的特异性。例如环状芽孢杆菌来源的 β-半乳糖苷酶多形成 $\beta(1\rightarrow4)$连接的 GOS[22,23]，而双歧杆菌 β-半乳糖苷酶多形成 $\beta(1\rightarrow3)$连接的 GOS[24]。本研究中的来源于 *L.plantarum*70810 的 β-半乳糖苷酶催化合成 GOS，如图 1 所示。

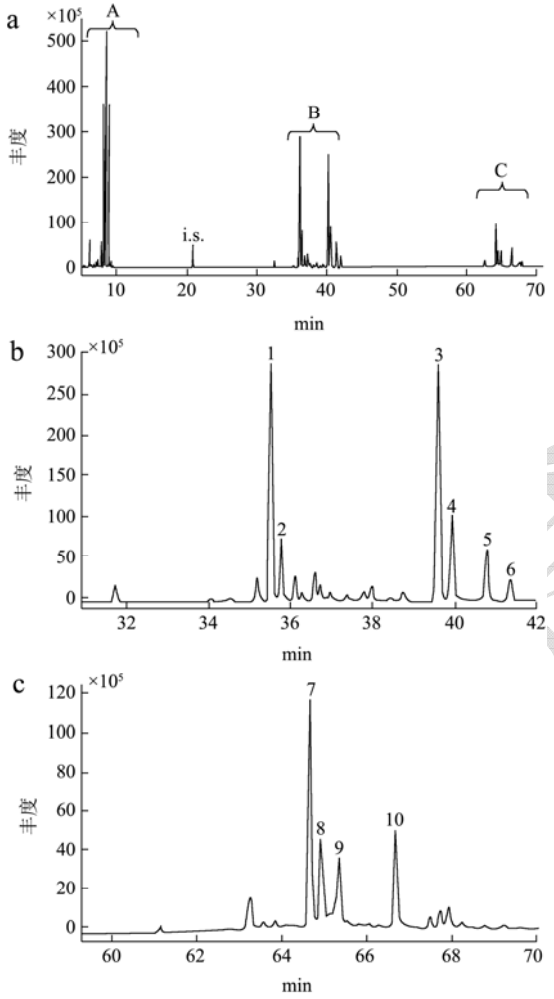


图 1 *L. plantarum*70810 β-半乳糖苷酶合成低聚糖半乳糖 GC-MS 图谱

Fig.1 GC-MS chromatogram profile of the TMS-oximes of galactose-oligosaccharides obtained from the reaction of lactose with β-galactosidase from *L. plantarum*70810

注：(a)：单糖；(b)：双糖；(c)：三糖；i.s.：内标；1~2：乳糖；3~5：异乳糖；4~6：6′-半乳二糖；7~10：6′-GOS；8~9：3′-GOS。

根据前期试验研究[25]中 GC-MS 鉴定结果可知，反应中主要有四种产物形成，分别为异乳糖（allo-lactose）、6′-半乳二糖（6'-Galabiose）、6'-半乳糖基乳糖（6′-GOS）、3'-半乳糖基乳糖（3′-GOS）。主要产物与其它来源 LAB 合成 GOS 的结果相一致[26-28]，倾向于合成 $\beta(1\rightarrow6)$和 $\beta(1\rightarrow3)$连接方式的 GOS。LAB 来源的 β-半乳糖苷酶具有安全性好，益生特性显著等优点，但是其合成 GOS 产量相对较低，而反应条件方面的优化研究也比较少，一定程度上限制了它的开发应用。酶法合成优化中，初始底物浓度和反应温度是影响 GOS 产量最重要的因素。

2.1.1 乳糖浓度对 GOS 合成的影响

在酶法合成中，底物乳糖浓度是影响 GOS 产量的最重要因素之一。较高的底物既增加了体系中半乳糖基受体浓度，有助于 GOS 的合成；同时又降低了水分活度，有助于减缓 GOS 的降解。相关文献报导中，底物浓度多选择 300~600 g/L 的乳糖浓度作为考察范围，常规的优化后产量集中于 30%~50%（*m/V*）之间[29]。

不同乳糖浓度对 GOS 合成的影响如图 2 所示，当乳糖浓度从 200 g/L 提高至 500 g/L，总 GOS 中占较大比例的异乳糖和 6′-GOS 的产量出现了大幅度增加，分别从 25.45 g/L 和 28.82 g/L 提高到了 58.53 g/L 和 68.26 g/L。β-半乳糖苷酶催化乳糖水解和转糖基的作用是平衡反应，底物浓度的增加可以有效降低反应体系中的水分活度，使得平衡反应朝着转糖基方向移动。同时可以看到，在初始酶量一定的情况下，随着底物浓度的增加，转糖基反应的初始反应速率有所上升，但整个体系达到平衡时间却不断延长，由 10 h 上升到 14 h。在不同乳糖浓度下，总 GOS 最高产量分别是 71.12、108.35、154.57 和 170.38 g/L，在反应混合物体系中所占比例分别是 35.56%、36.12%、38.64% 和 34.08%（*m/V*）。由此可见，底物浓度超过 400 g/L 后，总 GOS 在体系中的比例反而降低。这是因为乳糖常温下的溶解度在 205 g/L 左右，本研究中的反应温度为 37 ℃，过高的乳糖浓度将以沉淀析出，溶液中过量乳糖分子包裹着酶形成无活性中间产物，既影响反应进一步进行，也造成不必要浪费。综合考虑催化效率及总产量，选取 40%的乳糖浓度进行接下来的优化反应。

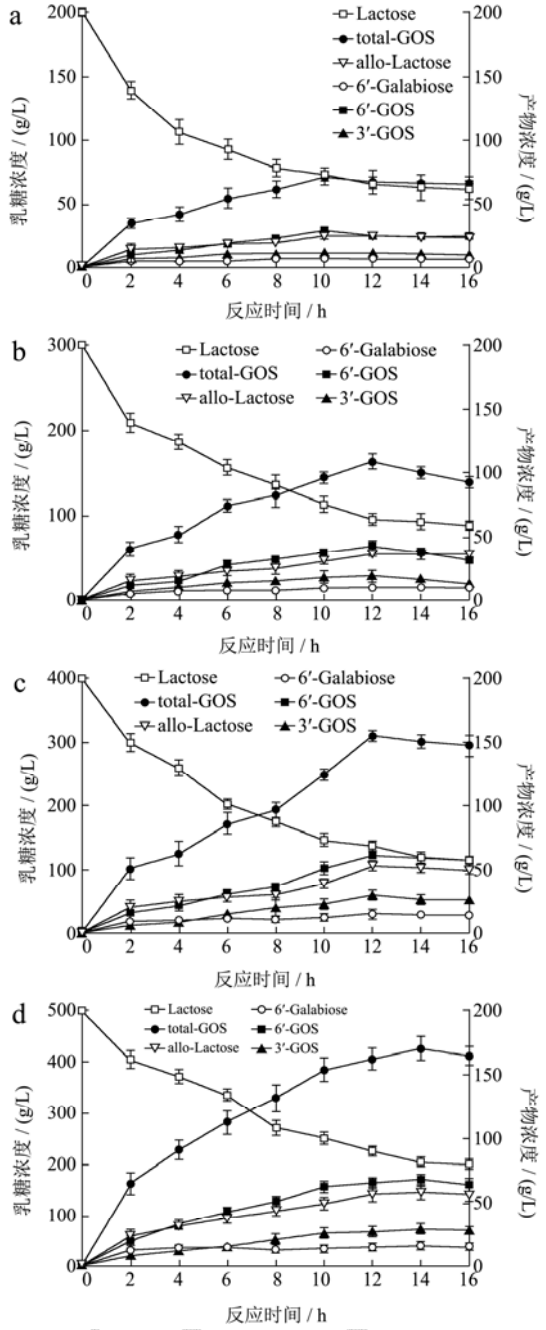


图 2 不同乳糖浓度对来源于 *L. plantarum* 70810 的 β-半乳糖苷酶催化合成 GOS 的影响

Fig.2 Effect of lactose concentration on the GOS production catalyzed by *β*-galactosidas from *L. plantarum* 70810

注：(a)：20%，(b)：30%，(c)：40%，(d)：50%。

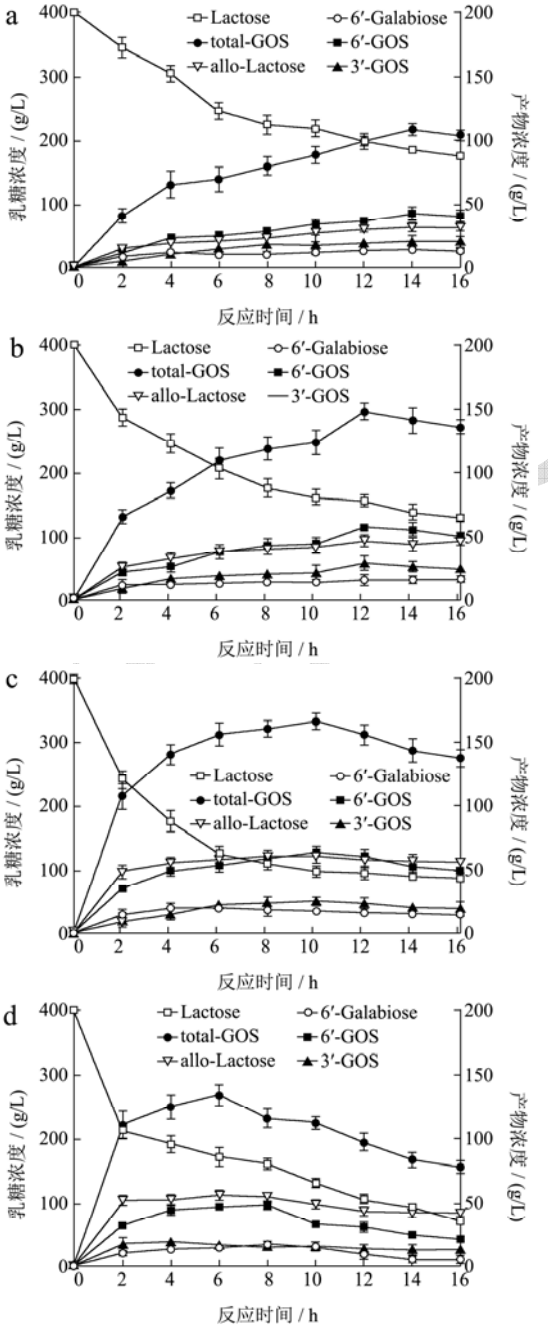


图 3 不同反应温度对来源于 *L. plantarum* 70810 的 β-半乳糖苷酶催化合成 GOS 的影响

Fig.3 Effect of temperature on the GOS production catalyzed by *β*-galactosidas from *L. plantarum* 70810

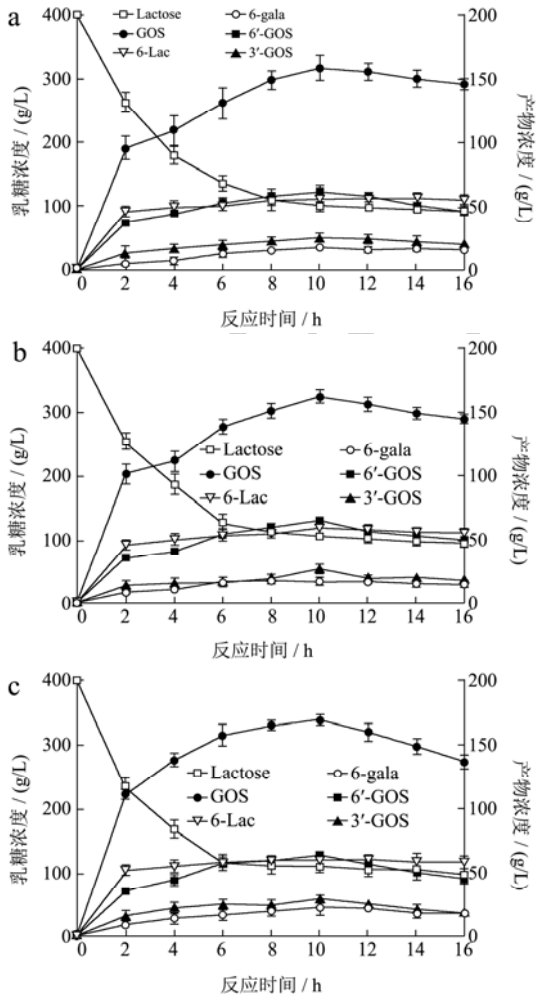
注：(a)：30 ℃，(b)：37 ℃，(c)：45 ℃，(d)：50 ℃。

2.1.2 反应温度对 GOS 合成的影响

酶是热敏感蛋白质，对于大多数的*β*-半乳糖苷酶，提高反应体系温度，不仅加速了酶促反应的速率，而且有助于提高底物的溶解度，增加 GOS 的积累；而过高的温度则会影响酶的稳定性，造成产量下降，因此选择合适的反应温度是优化过程一个关键的步骤。不同反应温度对 GOS 合成的影响如图 3 所示，随着温度不断提升，初始酶促反应速率显著上升，乳糖快速水解。在 30 ℃时，16 h 反应体系中乳糖残余量为 175.63 g/L，而在 50 ℃，16 h 时残余乳糖含量已降至 72.45 g/L。由于转糖基反应与水解反应呈正相关性，乳糖水解率提升的同时，总 GOS 合成速率和产

量也大幅度增加，在 30 ℃时，总 GOS 在 14 h 反应达到最高产量 108.28 g/L，而 45 ℃条件下只需 10 h，总产量达到 165.82 g/L。随着温度进一步升高，总 GOS 则开始急速下降，其中下降幅度最大的是 6′-GOS 和 3′-GOS，分别由 6 h 的 47.33 g/L 和 15.74 g/L 下降到 16 h 的 21.57 g/L 和 4.29 g/L，而异乳糖和 6′-半乳二糖在整个反应进程中变化相对比较平稳。总 GOS 产量在整个反应温度的变化中呈现了先快速上升，后缓慢下降的态势，可能的原因是反应体系在温度升高时，传质效果好，底物与酶充分快速的结合；而当温度继续上升，继而超过酶的最适反应温度，酶部分失活，GOS 合成能力下降。因此，接下来选取 45 ℃作为反应温度进行进一步优化。相关文献报道中，来源于 *P. furiosus*、*S. solfataricus*、*A.aculeatus*、*S. solfataricus* 和 *P. furiosus* 的 *β*-半乳糖苷酶在提高体系温度后，GOS 产量大幅上升[30,31]。但是，也有部分研究者发现，提高温度对来源于 *B.circulans*，*A. oryzae*，*K. lactis* 和 *K. marxianus* 的 *β*-半乳糖苷酶只有轻微或无相关性的促进作用[10,32,33]，这也表明不同来源的 *β*-半乳糖苷酶在相同的 GOS 合成条件中表现不同的催化特性。

2.1.3 pH 对 GOS 合成的影响



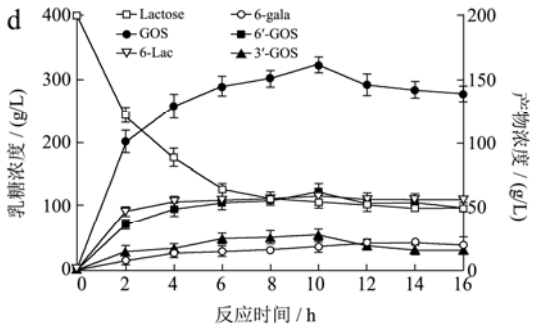


图 4 不同 pH 对来源于 *L. plantarum* 70810 的 *β*-半乳糖苷酶催化合成 GOS 的影响

Fig.4 Effect of pH on the GOS production catalyzed by *β*-galactosidas from *L. plantarum* 70810

注：(a)：pH 6.0；(b)：pH 6.5；(c)：pH 7.0；(d)：pH 7.5。

一般情况下，pH 通过作用反应体系中的酶，继而影响催化反应特性。通过酶学性质研究，来源于 *L. plantarum* 70810 *β*-半乳糖苷酶在 pH 6.0~8.0 范围内[17]，相对比较稳定。不同 pH 对 GOS 合成的影响如图 4 所示，随着 pH 的上升，GOS 的合成表现出相似的速率和产量，只是在该酶的最适 pH 7.0 条件下，总 GOS 产量略有升高，在 10 h 的时候达到了 168.24 g/L。故选择 pH 7.0 继续优化反应条件。pH 一直被认为是通过影响酶的动力学性质来影响 GOS 产量[34]。可能的机理是反应体系 pH 的变化可以选择性的控制 GOS 合成和降解的速率，从而达到 GOS 的积累[35]。类似于反应温度对 *β*-半乳糖苷酶的影响作用，pH 的作用更多表现为酶自身的特性，不同来源有着不同的催化特性。此外，很多研究发现，*β*-半乳糖苷酶催化乳糖水解和 GOS 合成通常具有相一致的最优 pH[35-38]。

2.1.4 酶浓度对 GOS 合成的影响

在生化反应中，底物浓度相同的条件下，酶促反应速率与酶初始浓度成正比，酶初始浓度越大，其酶促反应速率也越大。酶浓度对 GOS 合成的影响如图 5 所示，随着酶浓度不断提高，乳糖水解率迅速加快。在酶浓度 5 U/mL 时，反应 14 h 后，乳糖残余量为 180.64 g/L，而在 20 U/mL 时，反应 4 h 后，乳糖残余量就仅为 132.57 g/L。由于酶促反应速率加快，反应达到平衡的时间逐渐缩短，当酶浓度为 5、10、15 和 20 U/mL 时，产物达到最高产量所需时间分别是 14 h、10 h、6 h 和 4 h，而总 GOS 产量无显著变化。由此可知，酶浓度主要影响酶法合成的速率，对产物积累影响不大。综合考虑酶用量和时间最终选取浓度为 10 U/mL 进行反应。在此最优条件下，即乳糖底物浓度为 400 g/L，反应温度 45 ℃，体系 pH 7.0，酶浓度 10 U/mL，反应 10 h，总 GOS 产量达到 177.26 g/L，在体系中占 44.31%（*m/V*）。其中异乳糖、6′-半乳二糖、

6′-GOS 和 3′-GOS 的产量分别是 63.22 g/L、15.32 g/L、72.21 g/L 和 25.11 g/L。

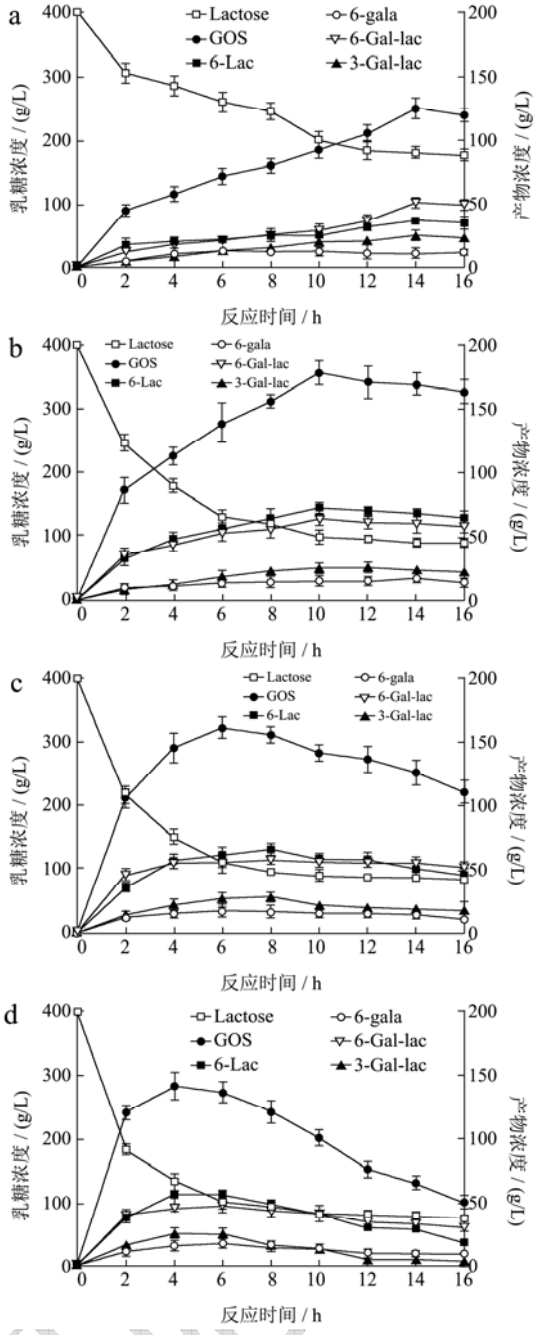


图 5 不同酶浓度对来源于 *L. plantarum*70810 的 *β*-半乳糖苷酶催化合成 GOS 的影响

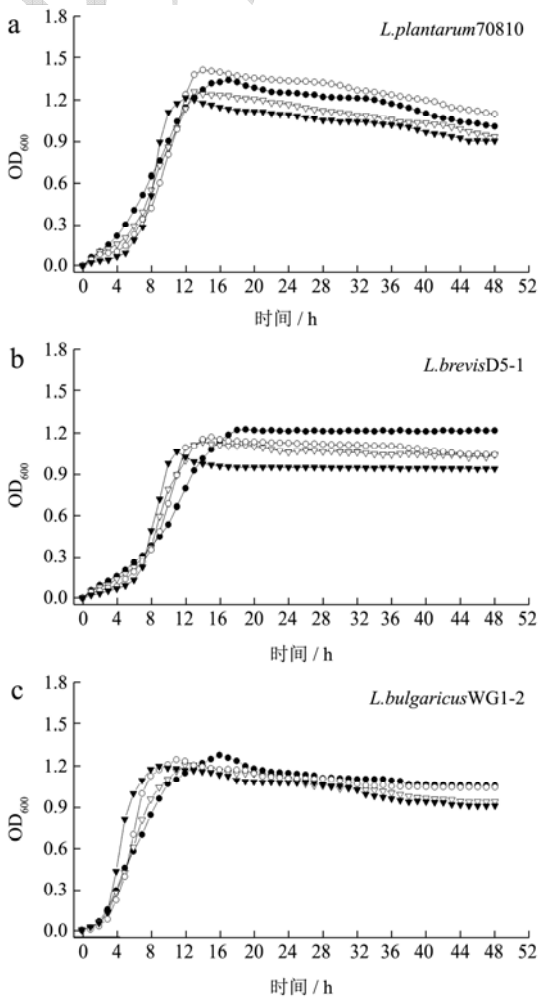
Fig.5 Effect of enzyme concentration on the GOS production catalyzed by *β*-galactosidas from *L. plantarum* 70810.

注：(a)：5 U/mL，(b)：10 U/mL，(c)：15 U/mL，(d)：20 U/mL。

2.2 低聚半乳糖体外增殖乳酸菌的研究

足够数量、活菌状态和有益健康功能是益生菌的核心特征。益生菌制品到消费者饮用时活菌数必须在 10^6 cfu/mL 才能发挥保健功能[39]，但在益生菌制品中很难保证消费前保持足够的活菌数。目前主要是寻找促进益生菌增殖的物质“增殖因子”，如寡聚糖类、多糖类、短链脂肪酸、部分蛋白水解物和天然植物及中草药提取物等，用以提高人体内益生菌的水平，或促进体外培养液中益生菌的增殖。关于利用寡聚糖作为碳源进行发酵的报导，已经证明不同细菌对寡糖具有不同发酵能力并表现出一定的选择性[40,41]。本研究中供试 LAB 在酶法合成得到的新型 GOS 和商品化 GOS30 和 GOS70 的均正常生长，这些低聚糖在糖苷键和单糖残基组成上的不同对 LAB 的最大生长密度、生长速率以及延滞期表现出直接的影响。

图 6 为 4 株供试 LAB 菌株在以乳糖或不同功能性低聚糖为碳源中纯培养 48 h 的生长曲线。图 7 为供试 LAB 菌株在不同碳源中培养的最大生长密度（OD_{600}）及达到该密度所用时间。表 2 为供试 LAB 菌株在不同碳源中培养的最大比生长速率（μ_{max}）和延滞期（lag）。综合图 6、图 7 和表 2 可以比较不同功能性低聚糖对 LAB 增殖作用。



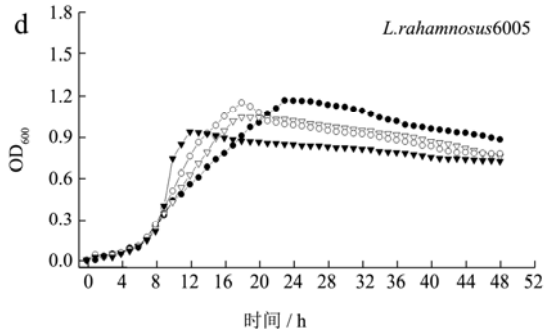


图6 供试LAB菌种以乳糖或不同功能性低聚糖为碳源的生长曲线

Fig.6 Growth curves of selected LAB strains with lactose and different functional oligosaccharides as carbon sources

注：Lactose: ▼；GOS_{30}: ▲；GOS: ▽●；GOS_{70}:◆。

L.plantarum 70810 在四种供试碳源中生长旺盛，达到最大生长密度的时间也比较接近，均在15 h左右，但最大 OD_{600} 和 μ_{max} 值存在较大差异。以 Lactose 为碳源条件下，*L.plantarum* 70810 表现出最大 μ_{max} 值，但最大 OD_{600}（1.22）则相对较小，Lag 值（6.40 h）较大。以本研究合成的新型 GOS 为碳源条件下，该菌株于 14 h 达到最大生长密度（OD_{600}=1.42，为本研究中不同碳源条件下最大 OD_{600}），μ_{max} 值为 0.25，相比较商品化的 GOS_{30} 和 GOS_{70}，均表现出明显的优势。延滞期方面，当以 GOS_{30}、GOS_{70} 和 GOS 为碳源时，*L. plantarum* 70810 的 lag 值分别是 5.00 h、3.52 h 和 6.01 h，与其对应的 μ_{max} 值表现出一定的负相关性。同样分离自泡菜的 *L.brevis* D5-1 与 *L.plantarum* 70810 相比，对不同碳源的发酵利用能力的差异情况非常相似，只是最大 OD_{600}（1.06~1.23）和 μ_{max} 值（0.12~0.35）相对偏小，lag 值略大，均在 4 h 之上。

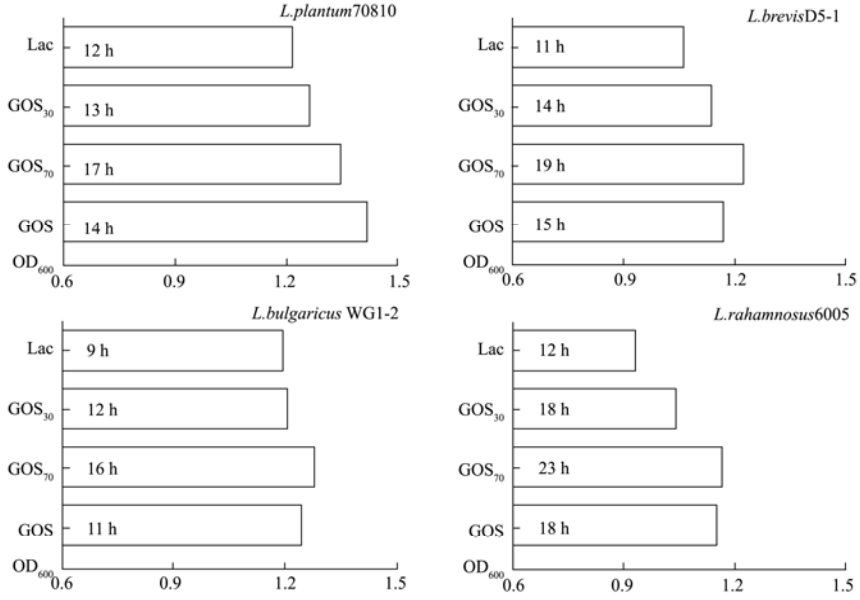


图7 供试LAB菌种以乳糖或不同功能性低聚糖为碳源的最大生长密度(OD_{600})及达到该密度所用时间

Fig.7 Maximum optical densities (OD_{600}), and hours passed to achieve them (inside the bars), attained by LAB during growth on lactose and different functional oligosaccharides, as carbon sources

表2 供试LAB在乳糖或功能性低聚糖为碳源中培养的最大比生长速率和延滞期

Table 2 Maximum growth rates (μ_{max}, h^{-1}) and lag parameters (lag, h) of LAB growing on lactose, and other functional oligosacchrides as carbon sources

低聚糖类型	*L. plantarum* 70810		*L.brevis* D5-1		*L.bulgaricus*WG1-2		*L. rahamnosus* 6005	
	μ_{max}	lag	μ_{max}	lag	μ_{max}	lag	μ_{max}	lag
Lactose	0.41±0.04	6.40±0.07	0.35±0.01	6.42±0.13	0.45±0.01	2.97±0.07	0.34±0.04	7.51±0.23
GOS_{30}	0.20±0.02	5.00±0.03	0.19±0.02	5.41±0.22	0.25±0.06	3.12±0.21	0.14±0.06	6.53±0.12
GOS_{70}	0.17±0.01	3.52±0.12	0.12±0.01	4.42±0.09	0.19±0.04	2.64±0.24	0.10±0.01	5.81±0.09
GOS	0.25±0.02	6.01±0.11	0..22±0.01	6.27±0.15	0.37±0.11	3.77±0.42	0.18±0.02	6.63±0.17

*L.bulgaricus*WG1-2 分离自酸奶制品，故接种于均含有乳糖成分的四种供试碳源均表现出很强的适应能力。μ_{max} 值较其他供试菌种普遍较大；lag 值均偏小，都在 4 h 以内；达到最大生长密度所需时间也普遍较短，除了 GOS_{70}，其他均在 12 h 以内。与此相对应的是分离自侗族酸肉中的 *L. rahamnosus* 6005，开始阶段

均经历了较长延滞期，达到最大生长密度所需的发酵时间最长，除乳糖因分子量小表现出被微生物优先利用的能力，其 OD_{600} 和 μ_{max} 上同样缺乏竞争力。相比较商品化的 GOS_{30} 和 GOS_{70}，本研究合成的 GOS 增殖这两株 LAB 在 μ_{max} 上优势明显，而最大 OD_{600} 分别为 1.245 和 1.149，与 GOS_{70} 增殖作用相当。

通过上述分析比较可见，虽然不同 LAB 之间存在个体差异，但是这些影响和作用表现出了一定的趋势：对于培养基中的各种半乳糖基碳水化合物，细菌优先利用低分子乳糖，然后才是低聚糖；以 β(1→6)糖苷键连接为主的低聚糖在最大比生长速率 μ_{max} 优势明显，但延滞期 Lag 值较长；而 β(1→4)糖苷键连接为主的低聚糖则表现为延滞期较短，最大比生长速率 μ_{max} 缺乏竞争力，且含量越高，发酵特征越显著。Sanz et al[20]等在研究低聚二糖结构与功能的关系中发现，β(1→6)连接的低聚二糖对混合菌群中的双歧杆菌增殖效果最好。Depeint et al[24]等通过临床试验研究则表明，与商业化的 GOS（Vivinal GOS 由来源于 A. oryzae β-半乳糖苷酶合成）比较，双歧杆菌来源 β-半乳糖苷酶合成的 GOS 具有不同结构和组成，益生功效更为显著，它主要糖苷键结构为 β(1→3)，而 Vivinal GOS 中多为 β(1→4)结构。Cardelle-Cobas 等[42]报导不同双歧杆菌和 LAB 和可以发酵利用乳果糖及各种不同 GOS 组分的纯品，唯独其中以 β(1→4)糖苷键连接的低聚三糖纯品为碳源时，部分双歧杆菌和部分 LAB 出现了不生长的情况，即使生长的 LAB，其细胞生长密度和最大比生长速率 μ_{max} 也很低。由此可见，肠道微生物尤其是益生菌对 β(1→6)和 β(1→3)糖苷键连接的 GOS 表现更高的选择性，对此现象可能的解释是，乳糖水解和转糖基的作用是平衡反应，这些益生菌来源的 β-半乳糖苷酶合成的“量身定制”的 GOS，更容易被益生菌本身所代谢，具有更强的益生特性[13-16]，而对 β(1→4)糖苷键连接的低聚糖的识别呈现出空间上的限制。

3 结论

来源于 *L.plantarum*70810 的 β-半乳糖苷酶催化合成 GOS，最优反应条件为底物浓度 400 g/L，体系 pH 7.0，10 U/mL 的酶浓度，45 ℃水浴 10 h，总 GOS 产量可达 177.26 g/L，在体系中占 44.31% (*m/V*)。与商业化的 GOS_{30} 和 GOS_{70}（主要是以 β(1→4)糖苷键连接的低聚三糖）比较，本研究中半乳糖残基以 β(1→6)糖和 β(1→3)苷键连接的新型 GOS 对于供试 LAB 增殖作用更为显著，表现在以较低的低聚糖比例（44.3%）达到与之高比例低聚糖（70%）相当的 LAB 生长密度，以及具有明显优势的比生长速率。虽延滞期上存在的短板，可以考虑各取所长，与商业化低聚糖进行复配，达到既能促进益生菌生长，又能取得可观的菌体密度。

参考文献

[1] 张志国,生庆海,王硕.HPLC 双柱法测定低聚半乳糖的平均聚合度[J].中国食品学报,2013,13(12):237-242
ZHANG Zhi-guo, SHENG Qing-hai, WANG Shuo. Determination of average DP of galactooligosaccharides by bi-Column HPLC [J] Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(12): 237-242

[2] Gibson G R, Probert H M, Van Loo J, et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics [J]. Nutrition Research Review, 2004, 17(2): 259-275

[3] Cao Pei, Wu Ling Yi, Wu Zhen, et al. Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(4): 2863-2872

[4] 王玉军,纪伟东,李永平,等.高效液相色谱法测定大豆低聚糖中的棉籽糖和水苏糖[J].现代食品科技,2010,26(7):750-752
WANG Yu-jun, JI Wei-dong, LI Yong-ping, et al. Determination of raffinose and stachyose in soybean oligosaccharides by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(7): 750-752

[5] Panesar P S, Kaur R, Singh R S. Biocatalytic strategies in the production of galacto-oligosaccharides and its global status [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 667-679

[6] Guo Q B, Douglas Goffa H, Cui S W. Structural characterisation of galacto-oligosaccharides (VITAGOS™) sythesized by transgalactosylation of lactose [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2018, 14: 33-38

[7] Srivastava A, Mishra S, Chand S. Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551 [J]. New Biotechnology, 2015, 32(4): 412-418

[8] Frenzel M, Zerge K, Clawin-Radecker I, et al. Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β-galactosidases [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60: 1068-1071

[9] 李良玉,贾鹏禹,李朝阳,等.模拟移动色谱高效纯化低聚半乳糖技术[J].中国食品学报,2016,16(3):138-145
LI Liang-yu, JIA Peng-yu, LI Chao-yang, et al. Efficient

purification technique of galacto-oligosaccharides using simulated moving bed chromatography [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(3): 138-145

[10] Boon M A, Janssen A E M, Van'T R K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzyrnatic synthesis of oligosaccharides [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26: 271-281

[11] Splechtna B, Nguyen T H, Steinock M, et al. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using *β*-galactosidases from *Lactobacillus reuteri* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54: 4999-5006

[12] Schwab C, Sorensen K I, Ganzle M G. Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42 *β*-galactosidases of lactic acid bacteria in *Lactococcus lactis* [J]. Systematic Applied Microbiology, 2010, 33: 300-307

[13] Splechtna B, Nguyen T H, Zehetner R, et al. Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using *β*-galactosidase from *Lactobacillus* sp. [J]. Biotechnology Journal, 2007, 2: 480-485

[14] Rabiu B A, Jay A J, Gibson G R, et al. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by *β*-galactosidase from *Bifidobacterium* species [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 2526-2530

[15] Tzortzis G, Goulas A K, Gibson G R. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68: 412-416

[16] Lim J S, Lee J H, Kang S W, et al. Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase [J]. European Food Research and Technology, 2007, 225: 457-462

[17] Rycroft C E, Jones M R, Gibson G R, et al. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(5): 878-887

[18] Sanz M L, Cote G L, Gibson G R, et al. Influence of glycosidic linkages and molecular weight on the fermentation of maltose-based oligosaccharides by human gut bacteria [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(26): 9779-9784

[19] Sanz M L, Cote G L, Gibson G R, et al. Selective fermentation of gentiobiose-derived oligosaccharides by human gut bacteria and influence of molecular weight [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56(3): 383-388

[20] Sanz M L, Gibson G R, Rastall R A. Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity *in vitro* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(13): 5192-5199

[21] Zhang H, Li W, Rui X, et al. *Lactobacillus plantarum* 70810 from Chinese paocai as a potential source of *β*-galactosidase for prebiotic galactooligosaccharides synthesis [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(5): 817-826

[22] Farkas E, Schmidt U, Tjiem J, et al. Regioselective synthesis of galactosylated tri- and tetrasaccharides by use of *β*-galactosidase from *Bacillus circulans* [J]. Synthesis, 2003, 5: 699-706

[23] Li W, Xiang X L, Tang S, et al. Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by *β*-D-galactosidase from *Bacillus circulans* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 3927-3933

[24] Depeint F, Tzortzis G, Vulevic J, et al. Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 87(3): 785-791

[25] 张宏志,马艳弘,黄开红,等.产 *β*-半乳糖苷酶乳酸菌的筛选及酶法合成低聚半乳糖的 GC-MS 分析[J].现代食品科技, 2015,31(12):355-361
ZHANG Hong-zhi, MA Yang-hong, HUANG Kai-hong, et al. Screening of *β*-galactosidase-producing lactic acid bacteria and analysis of the enzymatic synthesis of galactooligosaccharides by GC-MS [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 31 (12): 355-361

[26] Iabal S, Nguyen T H, Nguyen T T, et al. *β*-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides [J]. Carbohydrate Research, 2010, 345: 1408-1416

[27] Iabal S, Nguyen T H, Nguyen T A, et al. Characterization of a heterodimeric GH2 *β*-galactosidase from *Lactobacillus sakei* Lb790 and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59: 3803-3811

[28] Maischberger T, Leitner E, Nitisinprasert S, et al. *β*-Galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: Purification,

characterization and formation of galacto-oligosaccharides [J]. Biotechnology Journal, 2010, 5: 838-847

[29] Gosling A, Stevens G W, Barber A R, et al. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose [J]. Food Chemistry, 2010, 121: 307-318

[30] Cardelle-Cobas A, Villamiel M, Olano A, et al. Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using pectinex ultra SP-L [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 88(6): 954-961

[31] Hansoon T, Adlercreutz P. Optimization of galactooligosaccharide production from lactose using *β*-glycosidases from hyperthermophiles [J]. Food Biotechnology, 2001, 15(2): 79-97

[32] Boom M A, Van Der Oost J, De Vos W M, et al. Synthesis of oligosaccharides catalyzed by thermostable *β*-glucosidase from *Pyrococcus furiosus* [J]. Appl Biochemistry Biotechnology, 1998, 75(2-3): 269-278

[33] Petzelbauer I, Splechtna B, Nidetzky B. Development of an ultrahigh-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. III. Utilization of two thermostable *β*-glycosidases in a continuous ultrafiltration membrane reactor and galacto-oligosaccharide formation under steady-state conditions [J]. Biotechnology Bioengineering, 2002, 77(4): 394-404

[34] Huber R E, Kurz G, Wallenfels K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of *β*-galactosidase (*E.coli*) on lactose [J]. Biochemistry, 1976, 15(9): 1994-2001

[35] Hsu, C A, Lee S. L, Chou C C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by *β*-galactosidase from *bifidobacterium longum* BCRC 15708 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55 (6): 2225-2230

[36] Hsu, C A, Yu R C, Chou C C. Purification and characterization of a sodium-stimulated *β*-galactosidase from *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(4): 355-361

[37] Ji E S, Park N H, Oh D K. Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant *β*-galactosidase from *Thermotoga maritime* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(5): 759-764

[38] Park H Y, Kim H J, Lee J K, et al. Galactooligosaccharide production by a thermostable *β*-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(8): 1553-1558

[39] Sultana K, Godward G, Reynolds N, et al. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evolution of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 62(1): 47-55

[40] Huebner J, Wehling R L, Hutkins R W. Functional activity of commercial prebiotics [J]. International Dairy Journal, 2007, 17: 770-775

[41] Ignatova T, Iliev I, Kirilov N, et al. Effect of oligosaccharides on the growth of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* strains isolated from dairy products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 9496-9502

[42] Cardelle-Cobas A, Corzo N, Olano A, et al. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 149: 81-87

（上接第 290 页）

[19] 崔迎,李亚楠,沙淼,等.单核增生李斯特氏菌检测能力验证结果分析[J].食品安全质量检测学报,2018,9(14):3807-3812

CUI Ying, LI Ya-nan, SHA Miao, et al. Analysis on proficiency testing results of detection ability of *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(14): 3807-3812