

# 产 $\beta$ -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

张宏志, 马艳弘, 黄开红, 李亚辉

(江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

**摘要:**从分离自 13 种中国传统发酵食品的 148 株乳酸菌中筛选产高转糖基活性  $\beta$ -半乳糖苷酶的菌株。实验采用 X-Gal 平板初筛、薄层层析 (TLC) 复筛、气相色谱 (GC) 定量的方法, 得到一株产  $\beta$ -半乳糖苷酶转糖基活性最高的菌株, 并以乳糖为单底物, 利用该高转糖基活性  $\beta$ -半乳糖苷酶法合成低聚半乳糖 (GOS), 并采用 GC-MS 的方法对其各个组分进行鉴定。研究表明, 菌株 70810 所产  $\beta$ -半乳糖苷酶转糖基活性最高, 其合成 GOS 产率达到 39.23% ( $m/m$ ); 该菌株为实验室已鉴定乳酸菌, 为植物乳杆菌 (HQ259238) (*Lactobacillus plantarum*); 酶法合成的 GOS 产物鉴定为 9 种低聚二糖和 3 种低聚三糖, 主要结构多为  $\beta(1\rightarrow6)$  和  $\beta(1\rightarrow3)$  糖苷键。菌株 70810 来源于泡菜, 安全性好, 所产  $\beta$ -半乳糖苷酶转糖基活性最高, 且可不经纯化直接利用, 在食品与乳品加工等方面将具有很好的应用前景。

**关键词:**  $\beta$ -半乳糖苷酶; 转糖基; 乳酸菌; 低聚半乳糖; 气质联用仪 (GC-MS)

文章编号:1673-9078(2015)12-355-361

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.053

## Screening of $\beta$ -Galactosidase-producing Lactic Acid Bacteria and Analysis of the Enzymatic Synthesis of Galactooligosaccharides by GC-MS

ZHANG Hong-zhi, MA Yan-hong, HUANG Kai-hong, LI Ya-hui

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

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) strains producing  $\beta$ -galactosidases with high transgalactosylation activity were screened from 148 LAB strains found in 13 kinds of traditional Chinese fermented foods. The strain 70810 produced  $\beta$ -galactosidases with the highest transgalactosylation activity and was isolated using a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal) plate for the primary screening, thin layer chromatography (TLC) for the secondary screening, and gas chromatography (GC) for quantitation. Lactose was used as a single substrate, the synthesis of galactooligosaccharides (GOS) was catalyzed by  $\beta$ -galactosidases with high transgalactosylation activity, and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to identify each component. The results showed that the  $\beta$ -galactosidases produced by strain 70810 had the highest transgalactosylation activity, and the yield of GOS was 39.23 % ( $m/m$ ). This LAB strain was identified as *Lactobacillus plantarum* (HQ259238). Among the GOS products derived from enzymatic synthesis, there were nine disaccharides and three trisaccharides and the main structures contained  $\beta$ -1,6 and  $\beta$ -1,3 glycosidic bonds. Because strain 70810 was isolated from Chinese Paocai, it is safe. The resulting  $\beta$ -galactosidases have the highest transgalactosylation activity and can be directly used without separation and purification. Therefore, this strain has potential applications in food and dairy industries.

**Key words:**  $\beta$ -galactosidase; transgalactosylation; lactic acid bacteria; galactooligosaccharides; gas chromatography-mass spectrometry

$\beta$ -半乳糖苷酶, 简称乳糖酶, 既能水解乳糖为葡萄糖和半乳糖, 生产低乳糖食品, 以缓解乳糖不耐症;

收稿日期: 2015-06-04

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金自由探索项目 (CX(14)5059); 江苏省科技支撑计划 (农业) (BE2014347)

作者简介: 张宏志 (1985-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事功能性低聚糖和多糖的研究;

通讯作者: 马艳弘 (1972-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事生物技术与功能食品研究

同时又具有转半乳糖基活性, 可用于低聚半乳糖 (galactooligosaccharides, GOS) 的合成<sup>[1]</sup>。转糖基反应有两种形式: 分子内反应和分子间反应。分子内反应是将半乳糖基直接转移到葡萄糖上产生乳糖异构体; 而分子间的转糖基反应则产生二糖、三糖、四糖甚至分子量更大的多糖, 其分子结构一般是在还原性末端的半乳糖或葡萄糖分子上连接 1~7 个半乳糖基, 形成比较常见的 1,4 和 1,6 键型, 1,3 和 1,2 键型则相对较少。目前为止, 尽管具有转半乳糖基活性  $\beta$ -半乳

糖苷酶的微生物来源广泛,但在食品工业获得批准使用,并实现规模化生产的只有霉菌(*Aspergillus* spp.)和克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces* spp.)等少数几类微生物。现今对于开发其它来源,寻找安全性更好,酶学性质更稳定,并具有一定生物技术特性的 $\beta$ -半乳糖苷酶成为了该领域的研究热点。乳酸菌(LAB)是一类对人体健康有益的食品级微生物,一直是功能性食品开发的重要研究对象,而作为 $\beta$ -半乳糖苷酶的新兴优质来源,乳酸菌正日益受到国内外科学家的关注。

LAB来源的 $\beta$ -半乳糖苷酶是胞内酶,最适pH接近中性(pH 6.5~7.5),尤其适用于牛乳和乳清中乳糖的水解。乳酸菌作为 $\beta$ -半乳糖苷酶的来源,主要有三方面的优点:(1)LAB具有多种重要生理功能,被公认为是安全的(generally regarded as safe, GRAS)食品级微生物,应用于食品工业具有“先天优势”,更容易被消费者接受;(2)由于菌株本身安全性,LAB来源的 $\beta$ -半乳糖苷酶提取粗酶制品后,可直接用于生产而无需进一步纯化,既安全又经济,同时在不同的生产环境下,粗酶活性更具稳定性<sup>[2]</sup>;(3)据文献报导<sup>[3]</sup>,LAB来源的 $\beta$ -半乳糖苷酶应用于功能性低聚糖的生产,主要合成 $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)和 $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)等键型结构的低聚糖,相比较目前商业化的GOS(主要是 $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)键型),更易被肠道益生菌所利用,具有更显著的益生效果。

本文从分离自中国传统发酵食品的148株LAB中出发,采用X-Gal平板、薄层层析(TLC)、气相色谱(GC)等方法,筛选产高转糖基活性 $\beta$ -半乳糖苷酶的LAB,并采用气质联用(GC-MS)的分析手段,对 $\beta$ -半乳糖苷酶法合成的GOS产物进行研究,以期对功能性低聚糖的酶法合成生产寻找更加安全优质的酶源,同时明确其具体组分结构(如聚合度、糖苷键键型和单糖组成),为其在食品与乳品工业的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

148株供筛选LAB菌株分离自13种中国传统发酵食品如酸菜、发酵乳等,由本实验室保存。

### 1.2 培养基

MRS培养基(乳糖为单一碳源):蛋白胨10.0g、牛肉膏10.0g、酵母膏5.0g、乳糖20.0g、 $K_2HPO_4$ 2.0g、乙酸钠5.0g、柠檬酸三铵2.0g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g、吐温-80 1.0mL、蒸馏水1000

mL, 121 °C高压灭菌15 min。

MRS筛选培养基:将MRS培养基中加入20.0 g/L琼脂,混匀冷却至60 °C,并加入用0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌的X-Gal(30 mg/L),再混匀,倒平板,其余组分不变。

### 1.3 主要试剂

无水乙酸钠、柠檬酸三铵、磷酸、苯胺、二苯胺、丙酮、氯仿、冰乙酸、半乳糖、乳糖、 $K_2HPO_4$ 、吐温-80、NaCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaOH、HCl等均为国产分析纯。5-溴-4-氯-3-吡啶-吡喃半乳糖苷(简称X-Gal),购自Takara公司;苯基- $\beta$ -葡萄糖苷,购自Sigma公司;溶菌酶,购自北京索莱宝科技有限公司;邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷(oNPG)、邻硝基苯酚(oNP)、六甲基二硅氮烷(HDMS)和三氟乙酸(TFA)均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.4 仪器设备

LDZX-40AI型立式电热压力灭菌锅,上海申安医疗器械厂;THZ-98型台式恒温振荡器,太仓市华美生化仪器厂;PB-20型pH计,德国Sartorius公司;64RL高速冷冻离心机,美国Beckman公司;SHZ-III B循环水真空泵,上海亚荣生化有限公司;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;JY92型超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法),上海荣盛生物技术有限公司;TLC板Silica gel 60 No. 553, Merck公司;Agilent 6890N型气相色谱仪,美国Agilent公司;5975MSD-6890气相色谱-质谱联用仪,美国Agilent公司;BIO-TEX ELX 808全自动多功能酶标仪,美国BIO-TEX公司。

### 1.5 试验方法

#### 1.5.1 产转糖基活性 $\beta$ -半乳糖苷酶LAB的筛选

初筛:X-Gal是 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)的显色底物,在 $\beta$ -半乳糖苷酶的催化下会产生蓝色产物。常用于 $\beta$ -半乳糖苷酶的原位染色检测以及蓝白斑筛选。将148株LAB接种于MRS培养基活化2次后,分别涂布在含有X-Gal的MRS筛选培养基上,37 °C厌氧培养24 h,观察平板菌落是否变蓝。若菌落周围变蓝,则认定为初筛阳性菌株。

复筛:接种初筛的阳性菌株于试管进行复筛,培养后提取 $\beta$ -半乳糖苷酶粗酶液。采用TLC或GC的方

法测定其转糖基活性。选择复筛转糖基活性较高的菌株连续传代培养三次后,接种于试管培养,测定酶水解活力和转糖基活性,选择高产稳产的菌株传种斜面保藏。

### 1.5.2 粗酶液的制备

粗酶液的制备采用酶法辅助超声波破碎的方法,即在利用一定浓度的溶菌酶处理微生物细胞的基础上,再进行超声波破碎,具体操作如下:

将供试 LAB 菌液接种于 MRS 培养基进行培养,发酵前转接 2 次,37 °C 恒温培养 24 h。发酵液经冷冻离心(8000 g, 4 °C, 10 min)后倾去上清,将收集的菌体沉淀用磷酸盐缓冲液(50 mM, pH 6.5)洗涤 2 次,最后制成一定体积、菌体分散均匀的菌悬液。该菌悬液加入 1 mg/mL 的溶菌酶于 37 °C 下孵育 3 h,然后在冰浴条件下进行超声波破碎(200 W, 5 s/10 s, 15 min)处理,释放出胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶。处理后的菌悬液冷冻离心(8000 g, 4 °C, 30 min)后,倾去上清,即得到粗酶液。

### 1.5.3 酶水解活力测定方法

称取 2.8 mg 的 *o*NPG 溶于 10 mL 磷酸缓冲液(50 mM, pH 6.5)中配制成 2 mM 的 *o*NPG 溶液。取 1 mL 预热,加入适当浓度的酶液 1 mL,于 37 °C 下反应 10 min,加入 4 mL 的 1.0 M 的碳酸钠溶液终止反应。溶液静置 5 min 后,于 420 nm 处测定产物 *o*NP 的吸收值。酶活力单位定义为: $\beta$ -半乳糖苷酶催化 *o*NPG 水解,以每分钟释放 1  $\mu$ mol 的 *o*NP 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

### 1.5.4 酶转糖基活性测定方法

称取 1 g 乳糖置于离心管中,用 5 mL 磷酸缓冲液(50 mM, pH 6.5)使之溶解,水浴预热至 37 °C 后加入  $\beta$ -半乳糖苷酶(10 U/mL),在转速为 200 r/min 的恒温摇床中震荡反应 10 h 后,沸水浴灭酶 5 min,离心去蛋白后冻干保存。

#### 1.5.4.1 薄层层析法(TLC)

称取一定量的冻干样品,用 75% (V/V) 的乙醇溶液配制成 1% (m/m) 的样品溶液。取活化过的硅胶 G 玻璃板一块,用微量进样器点样,以氯仿:冰乙酸:水=30:35:5 为展层剂上行展层,当展层剂前沿达距薄板顶端 1 cm 处,停止层析,取出用吹风机吹干,然后以显色剂(苯胺-二苯胺-磷酸)喷雾,于 85 °C 烘箱中烘 10 min,各种糖即显出不同颜色,与不同分子量的标准糖比较,即可鉴定出样品中所存在的可溶性糖。

#### 1.5.4.2 气相色谱法(GC)

样品衍生:称取冻干的低聚糖样品约 5 mg,加入 350  $\mu$ L 2.5%氯化羟胺/吡啶溶液,75 °C 水浴 30 min;

分别加入 350  $\mu$ L 六甲基二硅氮烷和 35  $\mu$ L 三氟乙酸,45 °C 水浴 30 min;反应混合物 8000 g 离心 5 min;取上清过 0.45  $\mu$ m 有机滤膜,1  $\mu$ L 注入 GC 分析。

色谱条件<sup>[4]</sup>:色谱柱为 HP-5 毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m);进样口和检测器温度分别是 300 °C 和 320 °C;升温程序:200 °C 保持 15 min,以 3 °C/min 升至 260 °C,再以 1 °C/min 升至 280 °C,最后以 5 °C/min 升至 310 °C,保持 10 min;载气(N<sub>2</sub>)流速:1.0 mL/min,进样量 1  $\mu$ L;分流比 40:1。

定量方法(内标法):以苯基- $\beta$ -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。

### 1.5.5 低聚半乳糖的 GC-MS 鉴定

参照 1.5.4.2 方法对制备的低聚糖样品进行衍生化处理,进行 GC-MS 检测分析。

GC-MS 条件:对硅烷化的低聚糖样品进行气质联用分析。离子源(EI) 70 eV;传输线温度:310 °C,离子源温度:230 °C,溶剂延迟时间 3 min,扫描方式:全扫描;色谱柱为 HP-5 毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m);进样口温度是 300 °C;升温程序:200 °C 保持 15 min,以 3 °C/min 升至 260 °C,再以 1 °C/min 升至 280 °C,最后以 5 °C/min 升至 310 °C,保持 10 min;载气(He)流速:1.0 mL/min,进样量 1  $\mu$ L;分流比:40:1。

### 1.5.6 数据统计分析

实验数据均做 3 次重复,误差以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示;实验数据使用 SAS 8.2 统计分析和 origin 8.0 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 产转糖基活性 $\beta$ -半乳糖苷酶 LAB 的筛选

#### 2.1.1 X-Gal 平板初筛

乳酸菌能够合成  $\beta$ -半乳糖苷酶,但酶活力一般较低。很多研究发现酶法合成转糖基产物的产率受酶水解能力的影响。根据  $\beta$ -半乳糖苷酶水解 X-Gal 形成蓝色化合物的特点,通过菌落颜色变化,可初步筛选出具有半乳糖苷酶活性的阳性菌株。本实验从分离自中国传统发酵食品的 148 株 LAB 中筛出了菌落显色相对较大,且生长状况较好的 43 株(如图 1),并保藏于斜面培养基上。

#### 2.1.2 TLC 法复筛

接种初筛的 43 株活性菌株于液体培养基,恒温发酵培养 24 h 后,酶法辅助超声破壁得到粗酶液,通

过转糖基反应进行复筛, 并采用 TLC 法初步判定转糖基活性。结果如图 2 显示, 有 7 株初筛阳性的 LAB 在以乳糖为底物进行的转糖基反应中, 合成了较为明显的转糖基产物, 对应 4'-半乳糖基乳糖的斑点颜色最深, 初步可判断这些产物多为三个单糖分子组成的低聚糖。其中菌株 70810 表现出最好的转糖基活性。

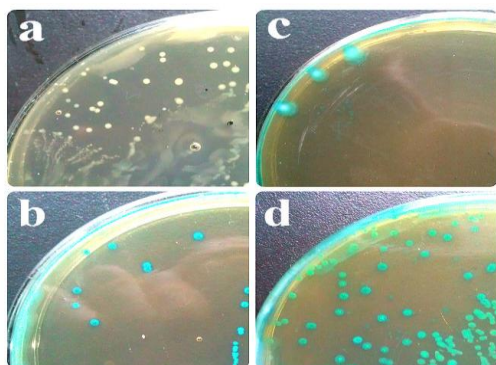


图 1 X-Gal 平板初筛部分结果

Fig.1 Representative results of primary screening using X-Gal plates

注: a, 阴性菌株; b、c 和 d, 阳性菌株 a, negative strains; b、c and d, positive strains.

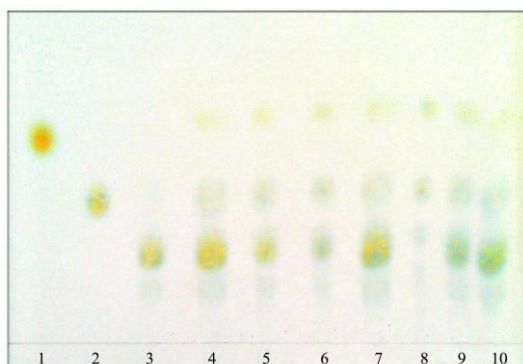


图 2 转糖基产物薄层色谱图

Fig.2 TLC chromatogram profile of the transgalactosylation products

注: 1, 半乳糖; 2, 乳糖; 3, 4'-半乳糖基乳糖; 4~10, 依次分别为 LAB 菌株 WG1-2、WG1-4、MB2-1、70810、GL2-1、LS-8、6005 转糖基产物。

### 2.1.3 气相色谱法定量

为了进一步确定 LAB 的转糖基活性, 选择复筛中转糖基活性较高的 7 株 LAB 菌株, 连续传代培养三次后测定酶水解活力, 并采用 GC 法准确定量转糖基产物的产量。结果见表 1。

表 1 结果显示, 不同菌株产生  $\beta$ -半乳糖苷酶的转糖基活性不尽相同, 其中菌株 70810 的酶表现出的转糖基活性 (39.23%) 最为显著, 因此选择此菌株做进一步研究。菌株 70810 为本实验室已鉴定菌株<sup>[5]</sup>, 系一株分离自四川泡菜的植物乳杆菌 (*Lactobacillus*

*plantarum*)。

表 1 产  $\beta$ -半乳糖苷酶 LAB 复筛结果

Table 1 Re-screening results of  $\beta$ -galactosidase-producing LAB

LAB	$\beta$ -半乳糖苷酶活性		转糖基产量/%
	酶活/(U/mL)	比活/(U/mg)	
GL2-1	1.81±0.32	7.51±0.12	17.13±0.42
WG1-2	1.22±0.13	4.21±0.31	30.33±0.22
WG1-4	3.15±0.24	5.14±0.12	19.65±0.23
MB2-1	5.52±0.15	6.15±0.25	18.94±0.12
70810	3.56±0.31	4.13±0.33	39.23±0.25
LS-8	2.57±0.22	2.25±0.41	20.12±0.32
6005	2.18±0.16	4.56±0.35	22.22±0.18

### 2.2 酶法合成低聚半乳糖的 GC-MS 鉴定

通过比较各峰的保留时间与半乳糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和棉籽糖标样的保留时间, 并参考文献中各种糖在色谱柱 HP-5 (5% 苯基-甲基聚硅氧烷) 上的出峰情况<sup>[4]</sup>, 可以发现低聚糖的出峰是按照相对分子量从小到大的顺序。由于受 HP-5 色谱柱自身性质所限 (最高使用温度为 325 °C), 在本研究中可以检测的上限是低聚三糖的衍生物。由此可以推知, 如图 3 所示, 在 *L. plantarum* 70810  $\beta$ -半乳糖苷酶的作用下, 乳糖水解成为半乳糖和葡萄糖, 同时通过转糖基反应形成了一系列不同聚合度和结构的 GOS, 其主要类型为低聚二糖和低聚三糖。另外, 对于还原性糖因为存在正反异构, 每种糖衍生后图谱上对应两个峰 (syn E 和 anti Z), 如半乳糖和葡萄糖等; 而对于非还原性的糖则对应一个峰, 如蔗糖和棉籽糖等。

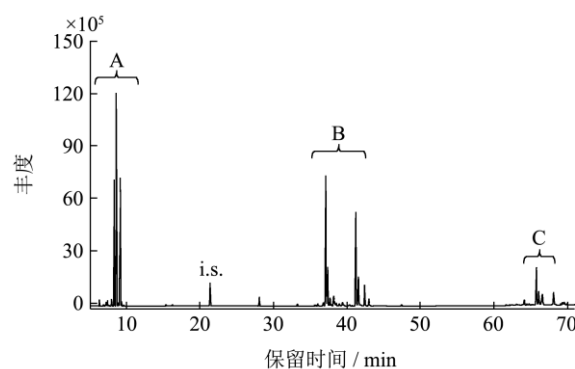


图 3 *L. plantarum*70810  $\beta$ -半乳糖苷酶合成低聚糖半乳糖 GC-MS 图谱

Fig.3 GC-MS chromatogram of the TMS-oxime derivatives of galactose-oligosaccharides (GOS) obtained from the reaction of lactose with  $\beta$ -galactosidase produced from *L. plantarum* 70810

注: a, 单糖; b, 双糖; c, 三糖; i.s., 内标。

由于 GOS 组成成分复杂多样, 且成分之间性质比较接近, 对其的分析, 分离和结构鉴定一直是糖化

学和食品研究中的难点和热点。近年来,利用 GC-MS 对衍生化处理糖类物质进行分离鉴定逐渐引起科研工作者的关注。GC-MS 原理是通过 GC 实现混合物的分离,然后利用 MS 得到离子化的化合物按照质荷比分离的质谱图。该方法简单高效,灵敏度高且低成本。本研究中,相同分子量的低聚糖衍生物,由于组成和

结构相似,其质谱数据中的特征峰离子也很相似,但不同糖苷键连接的低聚糖,其特征峰离子表现出的强度各不相同,通过与文献中给出的标样质谱数据相比较,并结合保留时间,可以有效地对其进行准确的鉴定。表 3 为半乳糖基二糖标样衍生物 GC-MS 质谱数据<sup>[4]</sup>。

表 2 半乳糖基二糖 TMSO 衍生物 GC-MS 质谱数据

Table 2 Characteristic mass data for TMS-oxime derivatives of galactosyl disaccharides

糖苷键	质谱数据 <sup>a</sup>
1,1	73 (79), 103 (22), 129 (23), 147 (48), 191 (99), 204 (56), 205 (18),217 (65), 361 (100)
1,2	73 (100), 103 (47), 147 (65), 191 (44), 204 (75), 205 (61), 217 (63),307 (26), 319 (76), 361 (23)
1,3	73 (85), 103 (23), 147 (57), 169 (12), 191 (17), 204 (100), 205 (42),217 (65), 244 (12), 319 (17), 361 (64)
1,4	73 (85), 103 (19), 147 (74), 191 (20), 204 (100), 205 (52), 217 (72),319 (34),361 (92)
1,6	73 (55), 103 (12), 147 (34), 191 (14), 204 (100), 205 (23), 217 (41),305 (8), 319 (10), 361 (57)

注: <sup>a</sup> 括号中的数字为碎片离子相对丰度。

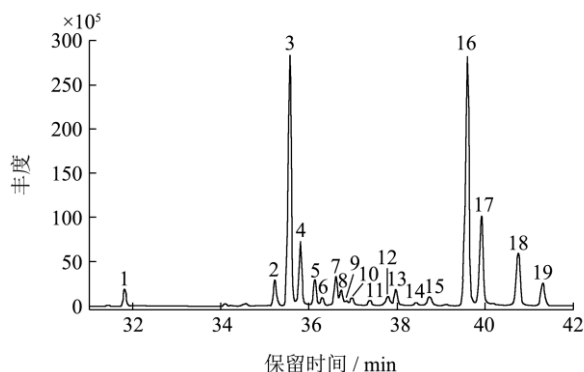


图 4 低聚糖半乳糖二糖衍生物 GC-MS 的总离子流图

Fig.4 Total ion chromatogram of the TMS-oxime derivatives of disaccharides of GOS

注: 1, 未知二糖; 2, 1'-半乳糖基葡萄糖 E; 3 and 4, 乳糖 E and 乳糖 Z; 5, 1'-半乳糖基葡萄糖 Z; 6, 1'-半乳糖二糖; 7, 3'-半乳糖基葡萄糖 E; 8, 3'-半乳糖二糖 E; 9, 2'-半乳糖基葡萄糖 E; 10, 2'-半乳糖基葡萄糖 Z; 11, 3'-半乳糖基葡萄糖 Z; 12, 2'-半乳糖二糖; 13, 3'-半乳糖二糖 Z; 14 and 15, 未知二糖; 16, 6'-半乳糖基葡萄糖 E; 17, 6'-半乳糖二糖 E; 18, 6'-半乳糖基葡萄糖 Z; 19, 6'-半乳糖二糖 Z。

由表 2 可知,半乳糖基二糖衍生物质谱特征碎片离子主要有  $m/z$  73、147、191、204、217、307、319 和 361,不同糖苷键的差异表现在这些离子的相对丰度上。图 4 是图 3 二糖部分的放大图,如图所示,该谱图共出峰 19 个,根据已有文献报导给出的不同糖苷键对应特征碎片离子种类和丰度<sup>[6-8]</sup>并结合部分标品,可以对其进行一一鉴定。色谱峰 2、5 和 6 的  $m/z$  191、 $m/z$  204 和  $m/z$  217 表现出异常的较高丰度,可判定为  $\beta(1\rightarrow1)$  连接的二糖;通过标品和保留时间比对,峰 3 和 4 为乳糖对应的两个峰;对于色谱峰 7、8、11 和 13,根据较高的碎片离子  $m/z$  205 与  $m/z$  244 相对丰度

平均值,可判定糖苷键连接为  $\beta(1\rightarrow3)$  结构;相对丰度较高的  $m/z$  319,对应于从葡萄糖残基的 C3-C4-C5-C6 位上丢失的 TMS-OH,故可判定色谱峰 9、10 和 12 为  $\beta(1\rightarrow2)$  连接结构;与  $\beta(1\rightarrow6)$  糖苷键标质量谱数据一致的是,色谱峰 16、17、18 和 19 均表现出相对丰度较高的  $m/z$  291 和 305,同时  $m/z$  205 相对丰度较低,另外其较长的保留时间进一步确认了其糖苷键连接结构。

色谱峰 1、14 和 15 未表现出明显的特征峰离子丰度特点,故暂时无法确定其结构。为了进一步确定这些半乳糖基二糖的单糖组成,以半乳糖取代乳糖作为单底物进行酶法合成(色谱图未给出),发现色谱峰 6、8、12、13、17 和 19 在两种底物的 GOS 混合物中均出现,表明这些色谱峰对应两个半乳糖连接的半乳糖二糖,则可推断其它色谱法对应的为半乳糖-葡萄糖连接的二糖。

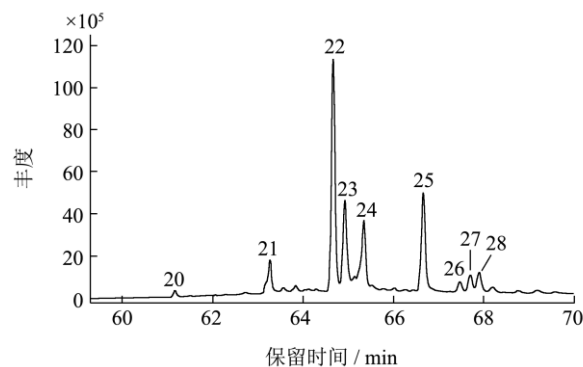


图 5 低聚糖半乳糖三糖衍生物 GC-MS 的总离子流图

Fig.5 Total ion chromatogram of the TMS-oxime derivatives of trisaccharides of GOS

注: 20 and 21, 未知三糖; 22, 6'-半乳糖基乳糖 E; 23, 3'-半乳糖基乳糖 E; 24, 3'-半乳糖基乳糖 Z; 25, 6'-半乳糖基

乳糖 Z; 26, 6'-半乳糖 E; 27, 未知三糖; 28, 6'-半乳糖 Z。

图 5 所示, 低聚三糖部分出现了对应的 8 个色谱峰。6'-半乳糖基乳糖已有文献报导, 并给出 GC-MS 资料<sup>[6]</sup>, 通过比对质谱数据和参考保留时间, 确认两个最高的色谱峰 22 和 25 为 6'-半乳糖基乳糖。在以半乳糖为单一底物的酶法合成中, 出现了色谱峰 27 和 28, 结合二糖部分出现的  $\beta(1\rightarrow6)$  半乳糖, 故推断它们为 6'-半乳糖三糖; 色谱峰 23 和 24 碎片特征离子峰相似, 且与实验室已有标品 4'-半乳糖基乳糖对应的色谱峰不能重合, 故通过排除法, 暂时判定它们为 3'-半乳糖基乳糖 (3'-GOS)。此外, 色谱峰 20、21 和 27 特征碎片离子与一般低聚糖衍生物差距较大, 推断是衍生过程中产生的未知物。

综上所述, 采用 GC-MS 的分析手段, 对来源于 *L. plantarum* 70810  $\beta$ -半乳糖苷酶法合成的 GOS 产物进行鉴定, 共确定 9 种低聚二糖和 3 种低聚三糖。经定量分析可知, 转糖基产物在体系中占 39.23% (w/w), 主要结构多为  $\beta(1\rightarrow6)$  和  $\beta(1\rightarrow3)$  糖苷键, 其中 6'-GOS、6'-半乳糖基葡萄糖、3'-GOS 和 6'-半乳糖的产量最高, 依次分别是 16.05%、13.82%、5.28% 和 2.78%。

### 3 结论

3.1 不同来源  $\beta$ -半乳糖苷酶合成 GOS 的产量各不相同, 酶源和反应体系条件是最直接影响因素。作为最早被批准应用于食品工业的霉菌和酵母属, 其  $\beta$ -半乳糖苷酶具有耐热温度高、耐酸、易分离提取 (大多数属于胞外酶) 等特性, 所以关于它们的研究也是最早最多的。例如 *A. oryzae*、*A. candidus*、*Penicillium* sp. 和 *P. simplicissimum* 等已报道霉菌来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶合成 GOS 的产量 ( $m/m$ ) 分别是 31%、37%、40% 和 31%; 部分酵母来源如 *K. lactis*、*Cryptococcus laurentii*、*Sporobolomyces singularis*  $\beta$ -半乳糖苷酶合成 GOS 产量分别是 25%、40% 和 40%。而 LAB 来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶由于属于胞内酶, 且转糖基活性相对较低, 开发利用一直受限。近年来随着 LAB 安全性好, 益生特性显著等优点逐步被认可, 筛选产高转糖基活性  $\beta$ -半乳糖苷酶 LAB 成为该领域新的研究热点。目前为止, 已有多种利用来源于不同 LAB 的  $\beta$ -半乳糖苷酶进行酶法合成 GOS 的研究。如来源于 *L. reuteri*、*L. acidophilus*、*Bifidobacterium longum* 和 *B. bifidum* 的  $\beta$ -半乳糖苷酶合成 GOS 产量分别达到了 38%、39%、33% 和 20%<sup>[7]</sup>。在此研究背景下, 本课题组从分离自 13 种中国传统发酵食品的 148 株乳酸菌中筛选产高转糖基活性  $\beta$ -半乳糖苷酶的菌株, 采用

X-Gal 平板初筛、薄层层析 (TLC) 复筛、气相色谱 (GC) 定量的方法, 最终确立了具有最高转糖基活性的菌株 70810 作为深入研究的对象, 经鉴定为植物乳杆菌 (*L. plantarum*), 其 GOS 产率达到 39.23%。

3.2 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。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。酶源是决定 GOS 结构的最重要因素, 不同微生物来源的  $\beta$ -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  $\beta$ -半乳糖苷酶多形成  $\beta(1\rightarrow4)$  连接的 GOS<sup>[9]</sup>, 而双歧杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶多形成  $\beta(1\rightarrow3)$  连接的 GOS<sup>[10]</sup>。本研究中的来源于 *L. plantarum* 70810 的  $\beta$ -半乳糖苷酶合成 GOS 的主要产物  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Lac、 $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Lac、 $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc 和  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Gal, 与其它来源 LAB 合成 GOS 的结果相一致<sup>[11~13]</sup>, 表明 LAB 来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶倾向于合成  $\beta(1\rightarrow6)$  和  $\beta(1\rightarrow3)$  连接方式的 GOS。Sanz et al<sup>[14]</sup>等在研究低聚二糖结构与功能的关系中发现,  $\beta(1\rightarrow6)$  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<sup>[10]</sup>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*  $\beta$ -半乳糖苷酶合成) 比较, 双歧杆菌来源  $\beta$ -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  $\beta(1\rightarrow3)$ , 而 Vivinal GOS 中多为  $\beta(1\rightarrow4)$  结构。由此可见, 肠道微生物尤其是益生菌对  $\beta(1\rightarrow6)$  和  $\beta(1\rightarrow3)$  糖苷键连接的 GOS 表现更高的选择性, 可能的原因是, 益生菌来源  $\beta$ -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。

3.3 近年来, 国外研究者在产  $\beta$ -半乳糖苷酶优良 LAB 菌株的筛选, 酶纯化和酶学性质等已经做了深入细致的研究, 而国内相关报道少之又少, 针对筛选到的优良 LAB 菌株所产  $\beta$ -半乳糖苷酶的系统研究 (酶纯化、酶学性质、酶法合成功能性低聚糖及其益生功效评价等) 逐渐成为新的热点。因此, 本课题组将依托筛选得到的优良乳酸菌 *L. plantarum* 70810, 下一步对其  $\beta$ -半乳糖苷酶及合成的功能性低聚糖进行全面深入的研究。

## 参考文献

- [1] 张志刚.耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的结构分析及同源建模[J]现代食品科技,2013,29(4):706-709  
ZHANG Zhi-gang. Structure analysis and homology modeling of thermostable  $\beta$ -galactosidase [J] Modern Food Science and Technology, 2013, 29(4): 706-709
- [2] Schwab C, Sørensen K I, Gänzle M G. Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42  $\beta$ -galactosidases of lactic acid bacteria in *Lactococcus lactis* [J]. Syst Appl Microbiol, 2010, 33: 300-307
- [3] Iqbal S, Nguyen T H, Nguyen H A, et al. Characterization of a heterodimeric GH2  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus sakei* Lb790 and formation of prebiotic galactooligosaccharides [J]. J. Agric. Food Chem., 2011, 59: 3803-3811
- [4] Cardelle-Cobas A, Martí'nez-Villaluenga C, Sanz M L, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives obtained by the action of two different  $\beta$ -galactosidases [J]. Food Chem, 2009, 114: 1099-1105
- [5] Feng M Q, Chen X H, Li C C, et al. Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from Chinese paocai and biosorption of Pb (II) by its exopolysaccharide [J]. J. Food Sci., 2011, 77: T111-T117
- [6] Brokl M, Soria A C, Martí'nez-Castro I, et al. Characterization of O-trimethylsilyl oximes of trisaccharides by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J. Chromatogr. A., 2009, 1216: 4689-4692
- [7] Park A, Oh DK. Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: current and perspectives [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010, 85: 1279-1286
- [8] Ruiz-Matute A I, Brokl M, Soria A C, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of tri- and tetrasaccharides in honey [J]. Food Chem., 2010, 120: 637-642
- [9] Li W, Xiang X L, Tang S, et al. Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by  $\beta$ -D-galactosidase from *Bacillus circulans* [J]. J. Agric. Food Chem., 2009, 57: 3927-3933
- [10] 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]. Am. J. Clin. Nutr., 2008, 87(3): 785-791
- [11] Iqbal S, Nguyen T H, Nguyen T T, et al.  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galactooligosaccharides [J]. Carbohydr. Res., 2010, 345: 1408-1416
- [12] Iqbal S, Nguyen T H, Nguyen H A, et al. Characterization of a heterodimeric GH2  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus sakei* Lb790 and formation of prebiotic galactooligosaccharides [J]. J. Agric. Food Chem., 2011, 59: 3803-3811
- [13] Maischberger T, Leitner E, Nitisinprasert S, et al.  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides [J]. Biotechnol. J., 2010, 5: 838-847
- [14] Sanz M L, Gibson G R, Rastall, R A. Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro [J]. J. Agric. Food Chem., 2005, 53: 5192-5199