

不同构型低聚半乳糖研究进展

陶 飞¹, 徐春祥¹, 张金秋¹, 王少伟¹, 林 慧^{1,2*}

(1. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008; 2. 中国药科大学食品质量与安全教研室, 南京 211198)

摘 要: 低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)是一种公认的益生元, 广泛存在于哺乳动物的乳汁中。GOS 是由 1~n 个半乳糖基和一个终端半乳糖基或葡萄糖基构成的糖。工业上普遍使用的酶法生产出的 GOS 是由一系列的单糖、反应剩余底物和不同结构的低聚半乳糖共同组成的混合物。由于聚合度和糖苷键连接位点差异, 目前确证的 GOS 结构有几十种。不同结构的 GOS 具有不同的化学性质、生物活性、加工稳定性和促使益生菌增长的能力。本文主要综述了在生产过程中影响 GOS 结构的因素, 不同构型的 GOS 的生物活性以及 GOS 混合物的分离和鉴定方法。GOS 的构型研究可以帮助特定构型 GOS 标准品的开发; 优化市售 GOS 产品的构型组成, 提升其益生价值; 还可以为未来医学药用研究提供依据。

关键词: 低聚半乳糖; 生物活性; 分离; 结构鉴定

Research progress of different structural galacto-oligosaccharides

TAO Fei¹, XU Chun-Xiang¹, ZHANG Jin-Qiu¹, WANG Shao-Wei¹, LIN Hui^{1,2*}

(1. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China; 2. Department of Food Quality and Safety, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT: Galacto-oligosaccharide (GOS) is recognized as a prebiotic, which widely exists in mammalian milk. GOS is composed of a chain of 1~n galactose units with a terminal glucose or galactose unit. GOS produced by enzymatic method is a mixture of different monosaccharides, reaction residues and oligosaccharides with different structures. Due to the differences in polymerization degree and position of glycosidic bonds, dozens of GOS have been confirmed. GOS with different structures have different chemical properties, bioactivity, processing stability and the ability to promote the growth of probiotics. This paper reviewed the factors affecting GOS structure, biological activity of GOS with different configurations and the separation method of GOS mixture and their structure characterization. GOS configuration research can help the development of GOS standards, optimize the configuration and composition of GOS products to improve their probiotic value. It can also provide a basis for future medical and medicinal research.

KEY WORDS: galacto-oligosaccharide; bioactivity; separation; structure characterization

1 引 言

根据 2016 年 12 月国际益生菌与益生元科学协会发布的共识申明, 益生元被定义为一种能被宿主带来健康的微生物选择性利用的底物^[1]。根据这一定义, 低聚半乳糖

(galacto-oligosaccharides, GOS)也是一种极具价值的益生元。GOS 能选择性的促进肠道益生菌的增长^[2], 尤其是乳酸菌和双歧杆菌属^[3], 并抑制病原体对肠上皮细胞的粘附, 从而增强人体免疫能力。GOS 被肠道菌群利用后的发酵产物主要为短链脂肪酸。这些代谢产物可改善肠道上皮功能,

*通讯作者: 林慧, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: lh_szjy@163.com

*Corresponding author: LIN Hui, Master, Senior Engineer, Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Beijing West Road, No.6, Gulou District, Nanjing 210008, China. E-mail: lh_szjy@163.com

降低肠道 pH, 促进钙镁吸收并减少炎症发生。GOS 可以诱导癌细胞凋亡, 相关体内体外试验均显示其在一定程度上有抑癌作用^[4]。在自然界中, 动物的乳汁存在一定量的 GOS, 这帮助母乳喂养的婴儿体内的双歧杆菌在肠道菌群中占主导地位, 因此 GOS 被广泛应用在婴儿配方食品中^[5]。

GOS 是一种功能性低聚糖, 是指在 1~*n* 个分子的半乳糖末端再结合一个半乳糖或葡萄糖分子的化合物, 分子式可表示为(Gal)_{*n*}-Glc/-Gal^[6]。GOS 在自然界中含量低, 难以提取, 化学合成步骤复杂且得率偏低, 难以应用于大规模的商业化生产。因此工业上普遍使用酶法合成, 即通过 β -半乳糖苷酶催化乳糖转化为 GOS。由于聚合度的不同和糖苷键连接位点的差异, 目前被确证、分离的 GOS 已有几十种。结构不同的 GOS 往往具有不同的化学特性、生物活性, 影响促进益生菌增长的能力和食品工业应用的稳定性^[7-9]。因此深入研究 GOS 的结构差异, 能够帮助优化 GOS 的生产工艺, 为未来开发高附加值的 GOS 产品和营养学研究奠定基础, 部分已发现 GOS 的结构见表 1^[10-12]。

2 影响 GOS 结构的生产因素

2.1 酶的影响

在酶法生产 GOS 的工艺中, 使用微生物中提取的半乳糖苷酶或直接使用含转化酶作用的细胞作为催化物质, 以乳糖为底物, 生产出的 GOS 混合物既包含不同聚合度的 GOS 产物, 也包含同种聚合度下的 GOS 同分异构体。这是因为酶的结构特性和催化机制影响 GOS 结构中糖苷键的位置。当半乳糖基和 β -半乳糖苷酶形成复合物时, 酶空间结构和催化机制不同, 半乳糖基进入酶活性位置的深

度产生差异, 从而影响该半乳糖基接近亲核受体。如果其与空间结构开阔的受体结合, 则容易形成 β -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键^[13,14], 反之则更易生成 β -(1 $\rightarrow$ 3)、 β -(1 $\rightarrow$ 4)的糖苷键形式。多项研究结果比对也进一步佐证了不同酶催化物质带来的产物结构差异: 使用 *Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus casei* 或 *Lactobacillus plantarum* 细胞作为催化物主要合成出糖苷键为 β -(1 $\rightarrow$ 6)的二糖 GOS, 使用 *Lactobacillus bulgaricus* 或 *Streptococcus thermophilis* 细胞作催化物则会合成包括 β -(1 $\rightarrow$ 6)、 β -(1 $\rightarrow$ 2)、 β -(1 $\rightarrow$ 3)多种结构的二糖 GOS。而当 *Bifidobacterium bifidum* 细胞作为催化物时, GOS 混合产物中会出现六糖和七糖, 而大部分的 β -半乳糖苷酶催化 GOS 产物聚合度往往在 5 以下^[10]。

2.2 反应条件

随反应时间和温度的不同, GOS 各结构组分也存在差异。这是因为转半乳糖苷化反应是一个复杂的过程, 在生成糖苷键的同时, 也会发生水解反应。这里的水解反应是转糖苷化的逆反应。例如, 乳糖在 *Bacillus circulans* 作用下, Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc 在 1 h 和 24 h 分别占总三糖的 95%和 35%; Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- β -(1 $\rightarrow$ 3)-Glc 在相同的时间点分别占总三糖的 4%和 18%^[15]。在不同反应温度下来源于 *B. circulans* 中的 β -半乳糖苷酶会产生不同比例的 β -(1 $\rightarrow$ 4)、 β -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键和不同聚合度的多糖^[16]。在另一个商业化的制备中, 使用 *Aspergillus aculeatus* β -半乳糖苷酶在更高的温度下能够制备更高浓度、高聚合度的 GOS 三糖; 且这种酶在 pH 6.5 时, 比 pH 4.5, 5.5, 7.5 制备出更高浓度 GOS 三糖^[17]。因此, 涉及时间、温度和 pH 等方面的反应条件变化带来的影响为生产特定构型的 GOS 提供了参考。

表 1 部分已发现 GOS 的结构
Table 1 Some structures of galacto-oligosaccharides that have been found

聚合度	GOS 结构	参考文献
二糖	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Gal	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Gal	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Gal	[11]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	[10]
三糖	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)[β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)]-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)[β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)]-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)[β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)[β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-Glc	[10]

续表 1

聚合度	GOS 结构	参考文献
四糖	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→6)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→6)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→3)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→6)-D-Gal	[10]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→6)-D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→3)-D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→6)-[β -D-Gal-(1→4)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)-[β -D-Gal-(1→6)-]D-Glc	[11]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-[β -D-Gal-(1→4)-]D-Glc	[11]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)-[β -D-Gal-(1→2)-]D-Glc	[11]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-[β -D-Gal-(1→6)-]D-Glc	[11]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→6)-[β -D-Gal-(1→2)-]D-Glc	[11]
	β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→6)-[β -D-Gal-(1→4)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)-[β -D-Gal-(1→6)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)-[β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→6)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)-[β -D-Gal-(1→2)-]D-Glc	[12]
五糖	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-[β -D-Gal-(1→4)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)-[β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→6)-[β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→6)-[β -D-Gal-(1→2)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-[β -D-Gal-(1→6)-]D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→2)-D-Glc	[12]
	β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→3)-D-Glc	[12]
六糖	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]
七糖	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc	[10]

注：表格中“ β -D-Gal-(1→n)-”表示 D 型半乳糖基，其 β 糖苷键连接位点在下一个糖基的 n 点位上；“-D-Gal”表示末端的 D 型半乳糖基；“-D-Glc”表示末端的 D 型葡萄糖基。

3 不同结构 GOS 的生物活性研究

GOS 作为功能性益生元在调节肠道菌群、提高免疫力等方面具有良好的生理功效。因其特殊结构, GOS 水溶性好, 粘度低, 在酸、热环境都能保持稳定。GOS 不易被人体口腔唾液和胃液消化, 可直达结肠内, 选择性地被双歧杆菌和乳酸菌属的益生菌吸收利用^[18], 在促进矿物质吸收或提高免疫力等方面也有显著功效^[19]。研究表明, 不同构型的 GOS 的益生功能也存在差异。有体外实验证明, 一些双歧杆菌倾向于优先分解聚合度为 3~4 的 GOS, 之后再分解 GOS 二糖^[20]; 也有实验表明, 婴儿肠道菌群体外分离株会优先利用聚合度 3~8 的 GOS^[21]。这说明在一定聚合度范围内(2~8), 更高聚合度的 GOS 可能对肠道发酵更有耐受力, 从而能在更远的肠道位点发挥益生元作用。控制 GOS 的聚合度, 能够有效地减少由于 GOS 消耗导致的副作用, 例如胀气或肠腔渗透压引起的通便作用^[22]。一例体外厌氧粪样混合培养的研究发现, 高聚合度的 GOS 益生功能更加持久, 且糖苷键为 β -(1 $\rightarrow$ 6) 的 GOS 三糖比糖苷键为 β -(1 $\rightarrow$ 4) 的 GOS 三糖拥有更强的益生作用。推测为不同的糖苷键对于不同的益生菌种因为空间结构适应性结合难度各不相同, 从而有不同的生物利用活性, 证明了糖苷键的不同也对益生作用产生影响^[23]。

4 不同结构 GOS 的分离测定

4.1 液相色谱分离测定

反向液相色谱是当今最主要的分离模式。它的重现性强、固定相和检测器的选择多样、可后端收集, 几乎可用于所有具备溶解性的有机物的分离, 因此常被运用于分析糖类物质^[24,25]。通常, 寡糖分析采用氨基柱或离子交换色谱柱进行分离, 以示差检测器(refractive index detector, RID)进行检测。而在一项实验中, 作者采用多种极性的亲水保留色谱柱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)对 GOS 进行分离, 并使用蒸发光散射检测器(evaporative light-scattering detector, ELSD)完成检测^[26]。HILIC 相对于氨基柱检测时间短, 且比离子交换柱在高聚合度的 GOS 上有更好的分离度; ELSD 检出限也比 RID 高 1~2 个数量级^[27]。有时, 一些试验也会通过衍生化处理给低聚糖添加一个疏水的发色或荧光基团, 以确保分离效果和检测灵敏度^[28,29]。

高效阴离子交换色谱和脉冲安培检测器串联(high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detector, HPAEC-PAD)也被应用于 GOS 产物的分离测定^[30,31]。这一方法利用糖类的弱酸性和结构差异, 提供了高效的分离。低聚糖组分结构越大, 就会带更多负电荷, 相应洗脱时间就越长^[32]。除了分子大小和电荷差

异, GOS 的糖苷键位差异带来的空间结构变化也会带来保留时间的差异, 因此可对 GOS 中的同分异构体进行分离^[33]。在国内一项实验中, 作者采用 HPAEC-PAD 对一份商业化 GOS 样品进行分离检测, 收集保留时间在 7.5~35 min 内的组分, 经过酶解验证其中有 15 种 GOS 组分^[34]。

4.2 气相色谱分离测定

气相色谱因其分辨力高和价格低的优点, 也开始被应用于糖类的测定。糖的沸点很高, 在分析前需进行衍生化处理生成更容易气化的物质。目前国内测定 GOS 的方法是将其酶解或水解处理后再衍生化进样, 根据酶解前后的单糖和半乳糖含量变化推算 GOS 含量^[25,35], 过程处理和计算非常复杂, 较少出现用气相色谱法检测 GOS 的报道。国外的一些实验表明, 对 GOS 进行三甲基硅烷衍生化处理, 通过气相色谱串联火焰离子化检测器可高效测定出 GOS 原料及部分婴配食品中的 GOS 含量。通过定位出峰顺序, 也可清晰的分辨出 GOS 二糖、三糖不同构型的响应峰^[36,37]。文献认为 GC 可以分离测定聚合度高达 11 的糖类物质, 再配合串联 MS 等使用方式, 在 GOS 分离测定上很有潜力。

5 GOS 的结构鉴定

当前有不少较为小众的分析方法被运用于糖类的结构辅助分析, 如 X 射线结晶法、红外光谱法、拉曼光谱法、电镜等。这其中尤以红外光谱使用较为常见。红外光谱主要通过收集糖类物质中各官能团对红外光产生的特定吸收峰, 根据吸收峰的波段来推测该糖类物质的官能团和糖环结构^[38,39]。质谱法(mass spectrometry, MS)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)是 2 个主流的鉴定低聚糖结构的方法。MS 比 NMR 有更高的灵敏度, 并且在测定有限数量、低聚合度的组分时更加简便。而 NMR 更适合测定未知物的结构, 并研究其动力学过程, 这源于 NMR 解释原子级别的结构的能力^[38,40~42]。

5.1 MS 鉴定

多项试验中, 实验者仅仅将 MS 和气相色谱、液相色谱等分离技术串联起来, 利用前端分离能力将不同聚合度和空间结构的糖类分开, 再通过不同构型糖的标准物质出峰比对进行结构判定^[43]。这类方法在鉴定二糖时较为有效, 但对于三糖以上的 GOS 难以发挥作用, 因为存在标准品价格昂贵、购买难度高等问题。鉴于此, 部分实验者采用气相色谱串联 MS 尝试直接对混合物中的糖的各组分结构进行鉴定^[44,45]。先用三甲基硅氧烷衍生混合糖, 此时非还原糖只产生单一衍生物, 而还原糖则会分离为一对易于分离的同分异构体从而在气相色谱图上出现 2 个峰。研究人员使用电子轰击质谱, 建立多元统计分析手段, 把不同标准品二糖、三糖的三甲基硅氧烷衍生物的质谱数据和其结构建立联系, 发

现拥有不同类型的糖苷键的同分异构糖在碎裂时会产生有一定相对强度的特征碎裂离子,通过构筑其特征碎裂离子的统计模型即可鉴定不同构型的二糖和三糖,因而不需要每次都使用标准品标定。此外,一些研究还使用基质辅助激光解吸(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)相关的质谱手段来分析低聚糖的聚合度,如采用MALDI串联傅里叶变换离子回旋共振质谱技术(Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT-ICR-MS)。相较于HPAEC-PAD, MALDI-FT-ICR-MS节约时间,有更大的吞吐量,且能通过调整离子导板电压在高聚合度低聚糖上得到足够的响应强度,在探索发酵培养基上的益生菌对不同聚合度GOS的选择性利用上有很大帮助^[46]。还有少数学者采用飞行时间(time of flight, TOF)质谱(TOF-MS)和MALDI串联,利用其精确地碎片分子量测定和高分辨的特点鉴定GOS的聚合度^[47]。不过总的来说,MS无法解析糖的键合方式,对糖的空间结构的鉴定上作用很小。

5.2 NMR 鉴定

在低聚糖的结构分析上,NMR是阐述未知化合物构型最为有效的方法^[48]。NMR是基于原子核磁性的一种波谱技术,其工作原理是原子核在磁场中受磁化作用,产生自旋角动量,当射频场和原子核震动频率一致时,就会促使原子核吸收能量能级跃迁,从而产生共振吸收信号^[49]。多项实验根据1D核磁共振(¹H-氢谱和¹³C-碳谱)、2D核磁共振(HSQC-异核单量子相关谱, COSY-同核化学位移相关谱, TOCSY-化学位移总相关谱, HMBC-异核多键相关谱等多种方式)分析,收集分子模型和分子动力学的模拟结果,能正确推断糖苷键的连接方式,鉴定出特定构型GOS的整体空间结构^[12,50]。鉴于核磁共振的信号非常丰富且灵敏度相对较低,所分析的GOS应具有一定数量和较高的纯度。这就为GOS结构分析带来困难,因为酶解生产出来的GOS是由一系列复杂且结构相似的低聚糖组成的混合体。因此,NMR需要和高分离能力的前端技术配合使用^[12]。在一个对市售6种GOS产品对比Vivinal GOS产品的结构鉴定实验中,实验者先使用液相色谱串联体积排除色谱分离各聚合度的GOS组分,接着进行聚合度比例分析,随后用HPAEC-PAD图谱和1D ¹H/¹³C NMR光谱进行对应分析,最终将市售的6款和Vivinal GOS比对的GOS产品中所含聚合度5以内GOS的空间结构全部鉴定出来^[11]。

6 GOS 构型研究的应用前景

针对GOS的各项研究展开已有数十年,但市面上特定构型的标准品种类极少,一般仅涉及低聚半乳糖和极少数三糖,这为各项研究带来障碍。GOS构型的研究可以应用于从GOS混合物中鉴定及分离纯化特定构型的纯品,对于GOS标准品的开发和指纹图谱定位有很大帮助。商业

生产的GOS大多被应用在婴配奶粉中,模拟人乳中的GOS。但通过和母乳GOS的对比发现,当前市售GOS的构型种类缺乏多样性且复杂性偏低^[51],其益生价值相对于母乳是否存在不足值得人们的关注。在一组GOS生产工艺探索试验中,部分半乳糖苷酶主要催化生产出高比例的低聚半乳糖^[52,53]。这部分GOS二糖会被小肠部分消化吸收,削弱益生作用,进而降低工业GOS产品的整体益生价值。开发GOS的构型相关的分离、鉴定技术,可以帮助工业GOS产品丰富各构型组分的多样性和复杂性,尽可能使市售GOS产品表现出和母乳GOS同等的益生功能。未来的深入研究甚至可以根据临床病理需要将特定构型的GOS按比例复配,针对特定肠道益生菌功能缺失开发医学药用价值。

7 总 结

GOS作为一类极具功能性的低聚糖,其益生元价值已得到广泛的认可。除了婴配食品,包括高端乳制品、保健品及健康无糖食品都已展开对GOS的应用研究。但基于商业酶法生产的GOS是含有葡萄糖、半乳糖、乳糖和许多种不同结构GOS的混合物,目前对市售各类产品的生物活性优劣的评判方式还存在缺失。各类分离、鉴定方法在经济性、操作性和适用性上都存在各自的缺陷。未来需要通过优化结合多种分析技术探索GOS的分离和鉴定方式,从构型的角度探索其对物化特性、生物活性的影响,这样才能建立完整的GOS营养价值判定体系,引导工业生产高经济价值、高活性、高稳定性的GOS产品。

参考文献

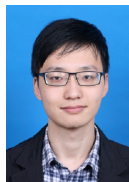
- [1] Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(8): 491–502.
- [2] 赵铭琪, 张宏达, 王立娜, 等. 婴儿配方乳粉中低聚糖添加量对肠道益生功能的影响[J]. *食品科技*, 2019, 44(1): 63–67.
Zhao MQ, Zhang HD, Wang LN, *et al.* Effects of oligosaccharide contents in infant formula milk powder on intestinal prebiotic function [J]. *Food Sci Technol*, 2019, 44(1): 63–67.
- [3] 刘萌颖. 婴儿配方奶粉中低聚糖对肠道益生功能的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
Liu MY. Effects of Oligosaccharides in infant formula milk powder on intestinal prebiotic function [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018.
- [4] 孙槐胜. 基于乳酸克鲁维酵母菌的高纯度低聚半乳糖绿色生产工艺开发[D]. 天津: 天津大学, 2016.
Sun HS. The green production of high-purity galacto-oligosaccharides by *Kluyveromyces lactis* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2016.
- [5] 张志国, 王硕, 生庆海. HPLC-ELSD法检测液态奶中的低聚半乳糖[J]. *食品与机械*, 2011, 27(3): 68–70, 75.

- Zhang ZG, Wang S, Sheng QH. Detection of galacto-oligosaccharides in liquid milk by HPLC-ELSD [J]. Food Mach, 2011, 27(3): 68–70, 75.
- [6] 冉丹, 张燕俊, 袁列江, 等. 离子色谱法检测婴幼儿配方奶粉中低聚半乳糖含量[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(4): 148–153.
- Ran D, Zhang YJ, Yuan LJ, *et al.* Determination of galactooligosaccharide in infant formula milk powder by ion chromatography [J]. Food Res Dev, 2019, 40(4): 148–153.
- [7] Ackerman DL, Craft KM, Townsend SD. Infant food applications of complex carbohydrates: Structure, synthesis, and function [J]. Carbohydr Res, 2017, 437: 16–27.
- [8] Sanz ML, Côté GL, Gibson GR, *et al.* Influence of glycosidic linkages and molecular weight on the fermentation of maltose-based oligosaccharides by human gut bacteria [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(26): 9779–9784.
- [9] Guo Q, Goff HD, Cui SW. Structural characterisation of galacto-oligosaccharides (VITAGOS™) synthesized by transgalactosylation of lactose [J]. Bioact Carbohydr Diet Fibre, 2018, 14: 33–38.
- [10] Torres DPM, Gonçalves MPF, Teixeira JA, *et al.* Galacto-oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics[J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2010, 9(5): 438–454.
- [11] van Leeuwen SS, Kuipers BJH, Dijkhuizen L, *et al.* Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products [J]. Carbohydr Res, 2016, 425: 48–58.
- [12] van Leeuwen SS, Kuipers BJH, Dijkhuizen L, *et al.* 1H NMR analysis of the lactose/ β -galactosidase-derived galacto-oligosaccharide components of Vivinal® GOS up to DP5 [J]. Carbohydr Res, 2014, 400: 59–73.
- [13] Frenzel M, Zerge K, Clawin-Rädecker I, *et al.* Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β -galactosidases [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 60(2): 1068–1071.
- [14] Yoon JH, McKenzie D. A comparison of the activities of three β -galactosidases in aqueous-organic solvent mixtures [J]. Enzyme Microb Technol, 2005, 36(4): 439–446.
- [15] Yanahira S, Kobayashi T, Suguri T, *et al.* Formation of oligosaccharides from lactose by *Bacillus circulans* β -galactosidase [J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(6): 1021–1026.
- [16] Farkas E, Schmidt U, Thiem J, *et al.* Regioselective synthesis of galactosylated tri- and tetrasaccharides by use of β -galactosidase from *Bacillus circulans* [J]. Synthesis, 2003, 2003(5): 699–706.
- [17] Cardelle-Cobas A, Villamiel M, Olano A, *et al.* Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using pectinex ultra SP-L [J]. J Sci Food Agric, 2008, 88(6): 954–961.
- [18] 孙纯, 祝文兴, 刘新利. 低聚半乳糖的研究进展[J]. 中国调味品, 2017, 42(11): 170–174.
- Sun C, Zhu WX, Liu XL. Research progress of galactooligosaccharides [J]. China Condiment, 2017, 42(11): 170–174.
- [19] 孙常文, 周清涛, 王超, 等. 低聚半乳糖概述及其功能效果原理分析[J]. 山东食品发酵, 2015, (3): 53–56.
- Sun CW, Zhou QT, Wang C, *et al.* Overview of galactooligosaccharides and analysis of their functional effects [J]. Shandong Food Ferment, 2015, (3): 53–56.
- [20] Gopal PK, Sullivan PA, Smart JB. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20 [J]. Int Dairy J, 2001, 11(1–2): 19–25.
- [21] Barboza M, Sela DA, Pirim C, *et al.* Glycoprofiling bifidobacterial consumption of galacto-oligosaccharides by mass spectrometry reveals strain-specific, preferential consumption of glycans [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(23): 7319–7325.
- [22] 毛丙永. 功能性低聚糖对肠道细菌的影响及机制[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- Mao BY. Effects of functional oligosaccharides on the gut bacteria and the mechanism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [23] 李伟. 功能性低聚糖的酶法合成及其生理功能评价[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- Li W. Enzymatic synthesis of functional oligosaccharides and evaluation of their physiological functions [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [24] 罗倩, 王晓丹, 王卿卿, 等. 低聚半乳糖混合物的分离与检测[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 392–395.
- Luo Q, Wang XD, Wang QQ, *et al.* Detection and separation of galacto-oligosaccharides [J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 31(10): 392–395.
- [25] 张志国. 低聚半乳糖检测方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(8): 115–119.
- Zhang ZG. Research progress of the analysis methods on galacto-oligosaccharides [J]. Food Res Dev, 2013, 34(8): 115–119.
- [26] 杨新磊, 陈波. 超高效液相色谱法直接测定糖浆中低聚半乳糖质量分布[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 1087–1094.
- Yang XL, Chen B. Direct determination of the mass profiling of galacto-oligosaccharides syrup by UPLC [J]. J Food Safe Qual, 2016, 7(3): 1087–1094.
- [27] Antonopoulos A, Favetta P, Lafosse M, *et al.* Characterisation of *t*-carrageenans oligosaccharides with high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. J Chromatogr A, 2004, 1059(1–2): 83–87.
- [28] Lane JA, Hickey RM. Analysis of bioactive food-sourced oligosaccharides by high-performance liquid chromatography [J]. Food Oligosaccharid, 2014, (3): 399–420.
- [29] 邱志超, 黄伟乾, 邓伟恒, 等. 荧光标记-酶识别-高效液相色谱法测定婴儿配方乳粉中反式低聚半乳糖[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(23): 6195–6201.
- Qiu ZC, Huang WQ, Deng WH, *et al.* Determination of trans-galactooligosaccharides in infant formula by combined analytical techniques of fluorescence labeling, enzymatic identification and HPLC [J]. J Food Safe Qual, 2018, 9(23): 6195–6201.
- [30] Lin H, Li S, Xu C, *et al.* Simultaneous determination of galactose, glucose, lactose and galactooligosaccharides in galactooligosaccharides raw materials by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection [J]. Food Chem, 2018, 263: 29–36.
- [31] Shi Y, Liu J, Yan Q, *et al.* *In vitro* digestibility and prebiotic potential of curdlan (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan oligosaccharides in *Lactobacillus* species [J]. Carbohydr Polym, 2018, 188: 17–26.
- [32] Corradini C, Bianchi F, Matteuzzi D, *et al.* High-performance

- anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection and capillary zone electrophoresis with indirect ultra violet detection as powerful tools to evaluate prebiotic properties of fructooligosaccharides and inulin [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1054(1-2): 165-173.
- [33] 邵波, 陈梅兰, 金月珠. 离子色谱快速检测壳寡糖含量[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(11): 1973-1977.
- Shao B, Chen ML, Jin YZ. Rapid determination of oligosaccharide by ion chromatography [J]. *J Pharm Anal*, 2017, 37(11): 1973-1977.
- [34] 张志国. 低聚半乳糖指纹图谱的构建[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(17): 152-158.
- Zhang ZG. Construction of galacto-oligosaccharides fingerprints [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(17): 152-158.
- [35] 潜尼测试科技股份有限公司. 一种测定配方奶粉中低聚半乳糖含量的检测方法: 中国, CN 201410415976.5 [P]. 2015-05-27.
- Pony testing international group Co., Ltd. A method to determine galacto-oligosaccharide in milk: China, CN 201410415976.5 [P]. 2015-05-27.
- [36] Julio-González LC, Ruiz-Aceituno L, Corzo N, *et al.* Purification of lactulose derived-galactooligosaccharides from enzymatic reaction mixtures [J]. *Int Dairy J*, 2018, 85: 79-85.
- [37] Sabater C, Prodanov M, Olano A, *et al.* Quantification of prebiotics in commercial infant formulas [J]. *Food Chem*, 2016, 194: 6-11.
- [38] 渠婷. 金钗石斛低聚糖的分离、结构鉴定及其功能性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- Qu T. Study on isolation, structural characterization and biological activities of oligosaccharide in *Dendrobium nobile* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [39] Santos MI, Gerbino E, Araujo-Andrade C, *et al.* Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy [J]. *Food Res Int*, 2014, 59: 53-60.
- [40] 宋丽萍. 葡聚糖蔗糖酶受体反应合成益生元的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- Song LP. Synthesis and characterization of prebiotics produced from acceptor reaction of glucansucrase [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [41] 魏京华, 陈历俊, 赵军英, 等. 液相色谱-质谱法快速检测 4 种乳源低聚糖[J]. *食品科学*, 2016, 37(14): 86-91.
- Wei JH, Chen LJ, Zhao JY, *et al.* Rapid and simultaneous detection of 4 milk oligosaccharides using LC-MS [J]. *Food Sci*, 2016, 37(14): 86-91.
- [42] 陈新新, 芦晶, 刘鹭, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定母乳中 12 种低聚糖[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 138-143.
- Chen XX, Lu J, Liu L, *et al.* Determination of 12 oligosaccharides in human milk by UPLC-MS [J]. *Food Sci*, 2018, 39(4): 138-143.
- [43] Julio-González LC, Ruiz-Aceituno L, Corzo N, *et al.* Purification of lactulose derived-galactooligosaccharides from enzymatic reaction mixtures [J]. *Int Dairy J*, 2018, 85: 79-85.
- [44] Brokl M, Soria AC, Martínez-Castro I, *et al.* Characterization of O-trimethylsilyl oximes of trisaccharides by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(22): 4689-4692.
- [45] Sanz ML, Sanz J, Martínez-Castro I. Characterization of O-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chromatographia*, 2002, 56(9-10): 617-622.
- [46] Barboza M, Sela DA, Pirim C, *et al.* Glycoprofiling bifidobacterial consumption of galacto-oligosaccharides by mass spectrometry reveals strain-specific, preferential consumption of glycans [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(23): 7319-7325.
- [47] Pham HTT, Dijkhuizen L, van Leeuwen SS. Structural characterization of glucosylated GOS derivatives synthesized by the *Lactobacillus reuteri* GtfA and Gtf180 glucansucrase enzymes [J]. *Carbohydr Res*, 2018, 470: 57-63.
- [48] Moreno FJ, Montilla A, Villamiel M, *et al.* Analysis, structural characterization, and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(11): 1519-1534.
- [49] 许飞, 田野. 核磁共振技术在食品检测中的应用研究[J]. *山东工业技术*, 2019, (5): 11.
- Xu F, Tian Y. The application research of NMR technology in food detection [J]. *Shandong Ind Technol*, 2019, (5): 11.
- [50] Kumar K, Deepak D. Structural characterization of novel milk oligosaccharide aurose from cow colostrums [J]. *J Mol Struct*, 2019, 1176: 394-401.
- [51] Chen XY, Gänzle MG. Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics? [J]. *Int Dairy J*, 2017, 67: 61-72.
- [52] González-Delgado I, Segura Y, Martín A, *et al.* β -galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS) [J]. *Microporous Mesoporous Mater*, 2018, 257: 51-61.
- [53] González-Delgado I, López-Muñoz MJ, Morales G, *et al.* Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* [J]. *Int Dairy J*, 2016, 61: 211-219.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



陶 飞, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: taofei001@126.com



林 慧, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: lh_szyj@163.com