

低聚半乳糖合成研究现状与产业的发展趋势

张金秋¹, 王少伟¹, 陶 飞¹, 徐春祥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: 低聚半乳糖是一种功能性低聚糖, 具有卓越的生理功能, 作为一种新型的食品营养强化剂, 近年来逐渐成为国内外学者研究的热点。根据国内外近二十年的研究资料, 本文综述了以乳糖为底物, 利用 β -半乳糖苷酶合成低聚半乳糖的反应机制; 讨论了乳糖底物的初始浓度、反应体系中的水活度、反应温度、反应 pH、抑制物(半乳糖、葡萄糖、低聚半乳糖产物)、反应时间等因素对低聚半乳糖产率的具体影响; 总结了不同来源的 β -半乳糖苷酶的类型、最佳反应条件下低聚半乳糖的产率, 工业化低聚半乳糖的生产工艺流程; 并对目前市场上销售的商用低聚半乳糖产品及其成分进行了介绍, 探讨了目前制约低聚半乳糖产业在我国大规模发展的因素, 以期促进我国低聚半乳糖产业的发展。

关键词: 低聚半乳糖; β -半乳糖苷酶; 产率影响因素; 酶法合成

Research status and development trend of galacto-oligosaccharide synthesis

ZHANG Jin-Qiu¹, WANG Shao-Wei¹, TAO Fei¹, XU Chun-Xiang¹, 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: Galactooligosaccharide is a kind of functional oligosaccharide with excellent physiological function. As a new type of food nutrition fortifier, galactooligosaccharide has gradually become a research hotspot of domestic and foreign scholars in recent years. According to the research data of the past 20 years at home and abroad, this paper reviewed the reaction mechanism of the synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase using lactose as substrate, discussed the effects of initial concentration of lactose substrate, water activity in the reaction system, reaction temperature, reaction pH, inhibitor (galactose, glucose, oligogalactose product) and reaction time on the yield of oligogalactose, summarized the types of β -galactosidase from different sources, the yield of galacto-oligosaccharides under optimal reaction conditions, and the production process of industrial galacto-oligosaccharides, introduced the commercial oligogalactose products and their components on the market, and discussed the factors restricting the large-scale development of oligogalactose industry in China, in order to promote the development of galactose industry in China.

KEY WORDS: galacto-oligosaccharide; β -galactosidase; yield factors; enzymatic synthesis

1 引 言

低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)是在

1~n($n < 7$)个分子的半乳糖末端再结合一个半乳糖或葡萄糖的结合寡糖^[1,2]。在自然界中 GOS 微量存在于动物乳汁中, 是一种具有天然属性的功能性低聚糖^[3]。作为“双歧杆菌生

*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_szy@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_szy@163.com

长因子”的 GOS, 其生理作用有: 可选择性地促进双歧杆菌等益生菌的增殖, 同时抑制有害菌的代谢; 具有出色的保水作用, 并且能有效刺激肠道蠕动, 增加粪便湿润度, 防止便秘; 促进肠道对钙、镁等元素的吸收, 防止骨质疏松; 防龋齿; 提高人体免疫力等作用^[4,5]。GOS 具有这些独特的理化性质和卓越的生理功能, 使其日渐成为国内外学者研究的热点。

目前, 功能性 GOS 的生产方式主要有 4 种: (1) 从自然界中提取; (2) 天然高聚糖的水解(酸法、酶法); (3) 酶法合成; (4) 化学合成。目前, 只有很少量的功能性 GOS 可以从自然界中提取, 且产量不高; 酸法、酶法降解虽然可以得到分子量分布较广的 GOS, 但副反应较多, 增加了产品后续纯化的难度; 而化学合成法目前只用于制备一些特殊的 GOS 供实验室研究使用, 还不具有大规模工业化前景。因此大部分功能性 GOS 主要采用酶法制备, 使用的酶主要是 β -半乳糖苷酶^[6-8]。

本文主要综述了功能性 GOS 酶法合成的研究现状与产业的发展趋势, 以期促进我国低聚半乳糖产业的发展。

2 β -半乳糖苷酶的反应机制

β -半乳糖苷酶的反应机制与 GOS 合成息息相关, 研

究 β -半乳糖苷酶反应的机制可以有针对性的找到影响 GOS 合成和产率的因素。在 GOS 的合成中主要发生了两类反应: 一类是乳糖的水解反应; 另一类是转半乳糖苷反应, GOS 是转苷反应的产物, 其最终的产率取决于这两种反应的平衡。

β -半乳糖苷酶发挥活性的第一步是底物分子的对接, 当底物为乳糖, 糖基部分为半乳糖, 而糖苷基部分为葡萄糖基(表示为图 1 中的 R_1 基团)时, β -半乳糖苷酶会表现出高度的底物特异性。当底物被连接到 β -半乳糖苷酶的活性位点上后, 就可以发生催化作用了。目前公认的是, 反应是通过一种保持机制发生的, 半乳糖基与酶之间形成共价键, 然后半乳糖基转移到亲核受体, 如图 1 所示^[4]。后续反应在这一点上开始有所不同, 反应结果取决于半乳糖基受体的不同, 如果半乳糖基的受体是水(即图 1 中 $R_2=H$), 则会释放出游离的半乳糖, 就是半乳糖的水解反应, 会导致乳糖和 GOS 的降解; 当半乳糖基的受体是另一种糖时(即图 1 中 $R_2=$ 葡萄糖, 半乳糖或乳糖), 反应会向 GOS 合成方向进行, 就是转糖苷反应^[9-11]。不同来源的 β -半乳糖苷酶反应条件不同, 对水和糖具有不同的选择性, 酶之间结构或反应机制也会有所差异, 从而导致 GOS 的产量和结构会有所不同^[4,12]。

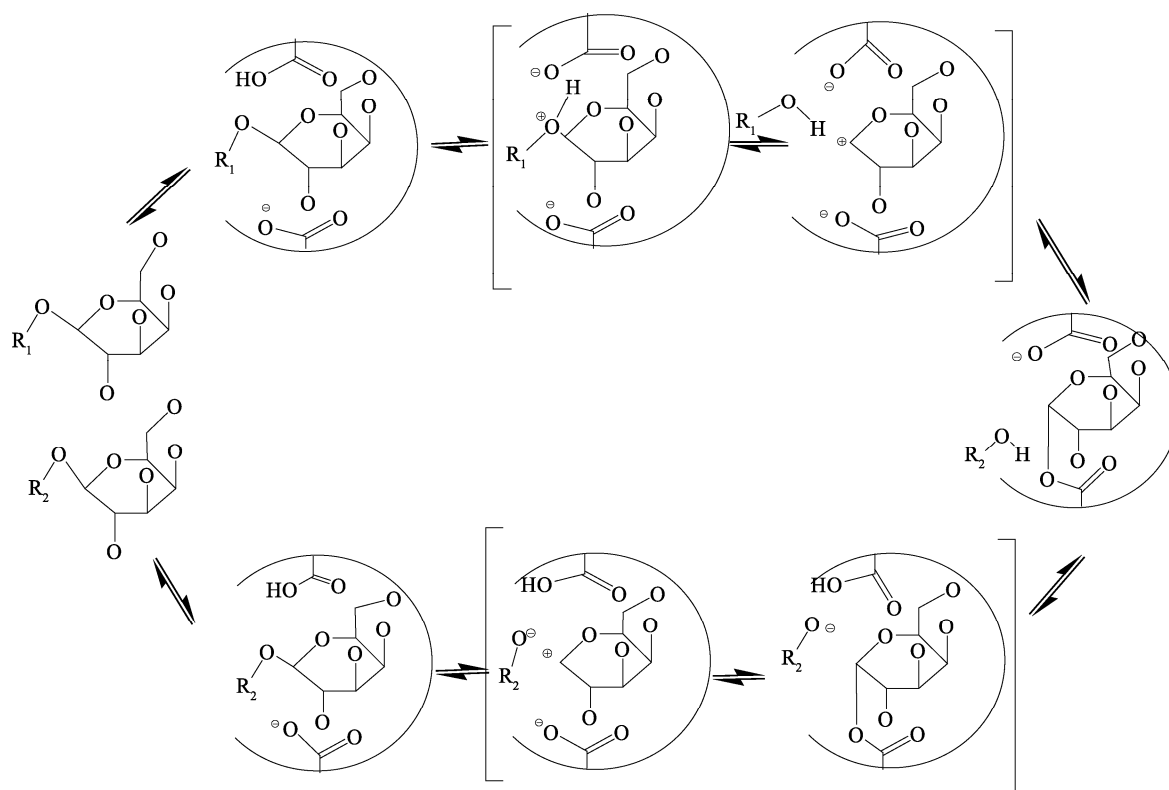


图 1 β -半乳糖苷酶的反应机制

Fig.1 Reaction mechanism of the β -galactosidase

3 影响低聚半乳糖产率的因素

GOS 的产率受很多因素的影响, 在不同的反应条件下, GOS 的产率不同。综合国内外的研究报道, 影响 GOS 产率的因素主要有以下几种。

3.1 乳糖初始浓度的影响

乳糖初始浓度对 GOS 的最终产率具有重要影响。乳糖初始浓度对 GOS 反应的影响体现在两方面: (1)增加了半乳糖受体的量; (2)减少了水的利用率。前者有望提高 GOS 的合成速率, 后者可降低 GOS 的降解速率和乳糖水解速率。这和 Gosling 等^[4]的研究相一致, Tokošová 等^[13-15]在 80 °C 下, 利用 300 g/L 的乳糖制得了 150 g/L 的 GOS; 同样在 80 °C 下, 提高了初始乳糖的浓度, 利用 600 g/L 的乳糖制得了 315 g/L 的 GOS。

但目前糖受体的浓度对最大 GOS 浓度的影响还难以定量评价, 因为目前有关于 GOS 合成的传统酶动力学常数报道还很少, 特别是在饱和底物浓度下的速率常数的报道, 这可能是由于 GOS 的形成率难以精确量化。相比之下, 水活度对转半乳糖基化的贡献更容易探究。Cruz-Guerrero 等^[16]研究发现, 当使用有机溶剂体系降低反应介质中的水活度时, GOS 的产率会提高。在某些情况下, 这种产量的增加证明是由于水解的减少, 这与普遍接受的理论一致, 即降低反应介质的水活度, 然后通过减少竞争性水解反应来增加酶转移反应的产量。有机溶剂的毒性限制了它们在食品中的应用, 但这些研究确实表明, 降低水的活度有助于提高 GOS 产量^[17-19]。因此, 随着乳糖初始浓度的增加, GOS 产量的增加可能很大程度上是由于高糖浓度导致了反应介质中的水活度降低^[20]。

3.2 温度的影响

乳糖在室温下的溶解度(220 g/L, 25 °C)相对较低, 升高温度可以增加乳糖的溶解度。因此, 最近涌现出许多针对嗜热酶的发现和特征描述的研究^[21,22]。这些嗜热酶可以在更高的温度下进行反应, 因此体系中乳糖的初始浓度也更高, 而乳糖的初始浓度又会增加 GOS 最终的浓度。然而, 在过高的温度下进行反应, 可能也会限制酶的活性^[23-25], 因此, 需要平衡升高温度对 GOS 最终产率的影响与酶活性损失的影响, 才能获得更高产率的 GOS。

3.3 pH 的影响

人们早就认识到 pH 对大肠杆菌 β -半乳糖苷酶水解乳糖和 GOS 合成的动力学有着不同的影响^[26], 这表明可以通过改变反应介质的 pH 值来选择性地控制 GOS 的合成和降解速率, 从而提高 GOS 的产量。然而, 最近许多研究也发现^[27-30], GOS 合成和半乳糖苷水解的最优 pH 值很接近。例如, 来自硫化叶菌的 β -半乳糖苷酶, 该酶对 GOS 合成的

最佳 pH 值是 6.0, 非常接近于对邻硝基苯酚半乳糖苷的水解最佳 pH 值 6.5^[4]。因此, 应严格控制反应体系的 pH, 才能有效提高 GOS 的产量。

3.4 抑制物的影响

半乳糖和葡萄糖通常被认为是许多 β -半乳糖酶水解乳糖的抑制剂, 其中半乳糖的抑制作用更强^[31]。半乳糖抑制乳糖水解一般是竞争性的, 因为半乳糖可与 β -半乳糖苷酶形成半乳糖基-酶中间体, 阻止乳糖进入活性部位。葡萄糖抑制乳糖水解显得更为复杂, 因为它对某些 β -半乳糖苷酶有竞争性抑制作用, 而对某些无竞争性抑制作用。研究发现这些单糖的抑制作用可以影响 GOS 的产量。半乳糖的存在对降低米曲霉 β -半乳糖苷酶消耗乳糖的速率比葡萄糖程度大, 而葡萄糖和半乳糖单独或共同存在时, 都会降低形成的 GOS 的最大浓度^[32]。Rastall 等^[33]还发现, 不同来源的酶也会表现出不同的特征。例如, 葡萄糖和半乳糖都会抑制乳酸克鲁维酵母中 β -半乳糖苷酶对乳糖的利用, 但只有半乳糖降低了该酶的最大 GOS 浓度。

Splechtn 等^[34]还发现, 当产物 GOS 达到一定浓度后也会抑制 β -半乳糖苷酶的活性。因此, 他研究使用了膜辅助的连续反应器(TiO₂ 超滤膜反应器), 可以在反应的过程中连续的移出产物, 解除产物对酶的抑制作用, 从而提高 GOS 的最终浓度。

3.5 反应时间的影响

反应时间也是影响 GOS 产率的重要因素, 因为反应体系中 β -半乳糖苷酶对 GOS 的合成和降解作用是同时进行的, GOS 在其峰值的浓度是由合成和降解反应的相对平衡决定的。前期主要以 GOS 的合成为主, 若时间过短, 底物还未反应完全, 会造成底物浪费; 若时间过长, 后期又会发生 GOS 的水解反应, 导致 GOS 产量降低^[35]。因此, 应控制好反应时间, 使 GOS 产率最大。针对不同来源的 β -半乳糖苷酶, GOS 达到最大产率通常需要 1~5 h^[36]。

4 低聚半乳糖合成研究现状

4.1 实验室研究

由于 GOS 具有独特的理化性质和卓越的生理功能, 在保健食品、乳制品、婴幼儿配方食品等多个领域都具有广泛的应用。因此, 如何针对不同需求和基于经济考量来选择合适的制备方法以及最佳反应条件亦成为一个研究热点^[37]。表 1^[37-40]对不同来源的 β -半乳糖苷酶的类型、最佳反应条件以及在这个条件下 GOS 的产率, 分别进行了总结归纳, 供后续研究参考。

4.2 工业化生产

工业化的 GOS 外观呈无色或者半透明的微黄色; 水溶性好, 保湿性较强, 水活度与蔗糖相似; 甜度为蔗糖的 20%~40%, 小于蔗糖甜度的一半, 口感清爽; 黏度低, 类似于高果糖糖浆; 不结合矿物质; 对酸和热都很稳定^[41]。

表 1 微生物来源的 β -半乳糖苷酶利用乳糖生成低聚半乳糖研究汇总
Table 1 A summary of studies on the production of galacto-oligosaccharides from lactose by microbial β -galactosidases

生物催化剂类型	酶源	拉丁学名	温度/℃	pH	乳糖浓度 /(g/L)	GOS 含量 /%, /[g/L]	GOS 生产率 /(g/L·h)
粗酶	米曲霉	<i>Aspergillus oryzae</i>	40	4.5	380	31	24
	环状芽胞杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	40	6.0	46	24	2.2
	双歧杆菌	<i>Bifidobacterium longum</i>	45	6.8	400	33	13
	嗜热脂肪地 芽胞杆菌	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	37	6.5	180	2[2]	0.4
	罗伊乳杆菌	<i>Lactobacillus reuteri</i>	30	6.5	205	38	3.9
	青霉菌	<i>Penicillium</i> sp.	55	4.0	400	40[160]	—
	踝节嗜热菌	<i>Talaromyces thermophilus</i>	40	6.5	200	50[100]	13
	纯化酶						
纯化酶	酵母杆菌	<i>Bullera singularis</i>	50	5.0	180	50[90]	3.9
	聚团肠杆菌	<i>Enterobacter agglomerans</i>	50	7.5	125	38[47]	3.9
	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	30	6.5	205	39	7.9
	单形青霉菌	<i>Penicillium simplicissimum</i>	50	6.5	600	31[183]	11
	整流糖多孢菌	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	60	6.5	600	44[264]	—
	梗孢酵母菌	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	60	5.0	200	39[78]	3.2
	重组酶						
	婴儿双歧杆菌	<i>Bifidobacterium infantis</i>	60	7.5	300	63[190]	13
重组酶	火球菌	<i>Pyrococcus furiosus</i>	80	5.0	270	22[60]	—
	硫化叶菌	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	80	6.0	600	53[315]	5.6
	海栖热袍菌	<i>Thermotoga maritima</i>	80	6.0	500	19[97]	18
	栖热菌	<i>Thermus</i> sp.	70	7.0	300	30[91]	—
	嗜热脂肪地 芽胞杆菌	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	37	6.5	180	23[41]	6.9
	全细胞						
	两歧双歧杆菌	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	39	6.8	500	20[99]	65
	甲苯处理细胞						
甲苯处理细胞	小红酵母	<i>Rhodotorula minuta</i>	60	6.0	200	38[76]	3.2
	大链担耳菌	<i>Sirobasidium magnum</i>	50	—	360	38[136]	3.2
	大链担耳菌	<i>Sirobasidium magnum</i>	50	—	360	67[242]	5.8
	固定化酶						
	白曲菌	<i>Aspergillus candidus</i>	40	6.5	400	37[148]	87
	米曲霉	<i>Aspergillus oryzae</i>	40	4.5	400	27	106
	环状芽胞杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	40	6.0	46	40	4.2
	掷孢酵母	<i>Bullera singularis</i>	45	3.7	300	54[120]	4.8
固定化酶	克鲁维酵母乳酸 菌	<i>Kluyveromyces lactis</i>	40	7.0	400	25[99]	25
	踝节嗜热菌	<i>Talaromyces thermophilus</i>	40	6.5	200	50	70
	固定化细胞						
	隐球酵母菌	<i>Cryptococcus laurentii</i>	40	4.3	200	40[80]	3.6
	掷孢酵母菌	<i>Sporobolomyces singularis</i>	55	5.0	600	40[242]	8.7

乳糖或纯化乳清均可用于工业生产，生产工艺流程图如图 2^[42-44]所示。GOS 的制备始于乳糖溶液，反应必须涉及 β -半乳糖苷酶的转糖基反应。

在搅拌槽或搅拌罐中加入初始乳糖溶液、 β -半乳糖苷

酶，控制好反应温度、反应 pH 等条件，进行分批次或连续反应。根据酶源的不同，会得到不同连接类型和不同聚合度的 GOS。然后经过食品级脱色剂进行脱色，离子交换进行脱盐^[45,46]。从乳制品中合成的 GOS 通常含有有益于骨骼

健康的钙, 但为了提高产品的纯度, 也可以将其去除。接下来根据分子大小进行过滤, 过滤后的液体经蒸发浓缩得到 GOS 糖浆或经冷冻干燥得到 GOS 粉末^[47]。该反应主要制得的是 β -(1→4) GOS 和 β -(1→6)GOS。

由于 GOS 具有低致龋性、低热值、低甜度等特点, 使得它们成为功能性食品的绝佳选择。目前市场上销售的商用 GOS 产品以及 GOS 的成分如表 2 所示^[48,49]。

5 结 论

随着人们生活水平的不断提高, “文明病”的增加, 饮食对人们健康的影响日益受到重视。享有“母乳益生元”之称的低聚半乳糖^[50], 具有许多其他糖类不可比拟的优点, 是一种新型的食品营养强化剂。研究表明, 提高乳糖底物的初始浓度, 降低体系中的水活度, 根据不同的 β -半乳糖

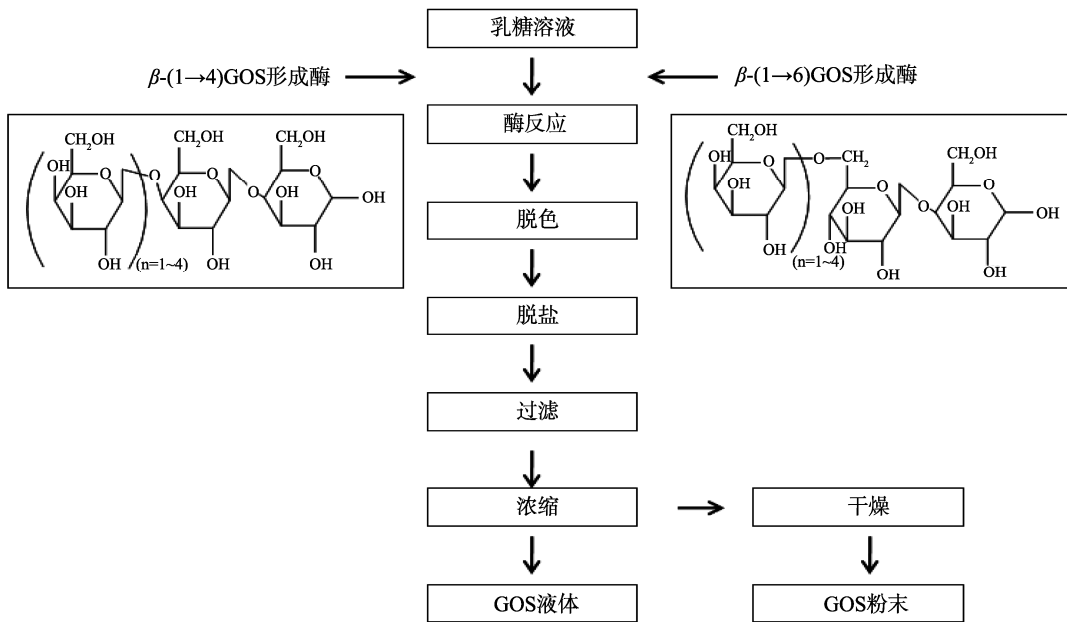


图 2 工业化低聚半乳糖生产工艺流程图
Fig.2 Process flow diagram of industrial GOS production

表 2 商业化 GOS 的组成及酶源
Table 2 Composition and enzyme source of commercialized GOS

商业化 GOS	生产商	酶源	拉丁学名	GOS 总量 /(g/100 g)	半乳糖 /(g/100 g)	乳糖 /(g/100 g)
CUP-oligo	日本东京日新糖制造 有限公司	隐球酵母	<i>Cryptococcus laurentii</i>	70	25-30	-
Oligomat 55	日本国株式会社养乐多本社	米曲菌	<i>Aspergillus oryzae</i>	50-60	18-39	10-22
TOS-100	日本国株式会社养乐多本社	嗜热链球菌	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99-100	0	-
Bimuno 糖浆和粉末	英国米尔顿凯恩斯克拉萨多 有限公司	双歧杆菌	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	48-55	12	22
Vivinal	荷兰兹沃尔弗里斯兰 食品公司	环状芽孢杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	57-59	0.8-1.3	10-23
Purimune 粉末	美国伊利诺伊州玉米制品国 际公司	环状芽孢杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	90-92	0.5	7-10
保龄宝低聚半乳糖粉末	中国保龄宝生物股份 有限公司	-	-	90	-	10
量子高科牌低聚半乳糖	中国量子高科生物股份有限 公司	-	-	≥57	-	-

苷酶性质选择其最适的反应温度、反应 pH 等, 再在反应的过程中利用膜辅助连续反应器, 不断地移出产物, 从而可以在很大程度上提高 GOS 的产率。然而, 目前我国依然存在两个主要因素制约着 GOS 的大规模发展: 一是高昂的 GOS 分离纯化成本; 二是如何获得性能优良的 β -半乳糖苷酶^[51,52]。因此, 加强对 GOS 产物分离提纯方法的研究以及运用生物学技术获得活性更高的 β -半乳糖苷酶将具有很高的经济效益和科研价值。

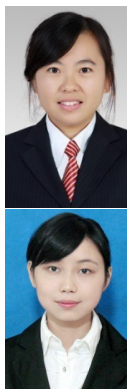
参考文献

- [1] 杨晓波, 李凯锋, 吴洁, 等. 婴幼儿米粉中低聚半乳糖的测定[J]. 中国乳业, 2016, 3: 53–58.
Yang XB, Li KF, Wu J, *et al.* Determination of oligomeric galactose in riceflour for infants [J]. China Dairy, 2016, 3: 53–58.
- [2] Sean A, Thierry B, Julien M, *et al.* Determination of β -galactooligosaccharides by liquid chromatography [J]. Int J Anal Chem, 2014, 14: 768–776.
- [3] 张志国, 孙亚范, 田玉新, 等. IC 指纹图谱测定婴幼儿配方奶粉中低聚半乳糖[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(12): 154–158.
Zhang ZG, Sun YF, Tian YX, *et al.* IC fingerprint determination of galactooligosaccharide in infant formula milk powder [J]. Food Res Dev, 2018, 39(12): 154–158.
- [4] Gosling A, Stevens GW, Barber AR, *et al.* Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose [J]. Food Chem, 2010, 121: 307–318.
- [5] 董艺凝, 陈卫, 邓文君, 等. 基于指纹图谱的食品级低聚半乳糖组成分析与有效组分含量推算[J]. 食品与机械, 2018, 34(7): 54–58.
Dong YN, Chen W, Deng WJ, *et al.* Composition analysis of food-gradegalactooligosaccharide and calculation of effective component contentbased on fingerprint [J]. Food Mach, 2018, 34(7): 54–58.
- [6] 薛雅莺, 张翼鹏, 杨海军. 低聚半乳糖的制备和应用进展[J]. 中国食品添加剂, 2012, s1: 93–95.
Xue YY, Zhang YP, Yang HJ. Advances in the synthesis and applicationof galactooligosaccharides [J]. China Food Addit, 2012, s1: 93–95.
- [7] 张晓萍, 段钢. 功能性低聚糖酶法制备研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(4): 159–165.
Zhang XP, Duan G. Recent progress on enzyme preparation of functional oligosaccharides [J]. Food Ferment Ind, 2011, 37(4): 159–165.
- [8] You S, Zhang J, Yin Q, *et al.* Development of a novel integrated process for co-production of β -galactosidase and ethanol using lactose as substrate [J]. Biol Technol, 2017, 230: 15–23.
- [9] 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]. Micro Meso Mat, 2018, 2(257): 51–61.
- [10] Oh SY, Youn SY, Park MS, *et al.* Synthesis of β -galactooligosaccharide using bifidobacterial β -galactosidase purified from recombinant *Escherichia coli* [J]. J Micro Biotech, 2017, 27(8): 1392–1400.
- [11] Srivastava A, Mishra S, Chand S. Synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose using immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551 [J]. J Molec Catal B: Enzymat, 2016, 123: 147–153.
- [12] Carević M, Ćorović M, Mihailović M, *et al.* Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin [J]. Int Dairy J, 2016, 54: 50–57.
- [13] Tokošová S, Hronská H, Rosenberg M. Production of high-content galacto-oligosaccharides mixture using β -galactosidase and *Kluyveromyces marxianus* entrapped in polyvinylalcohol gel [J]. Chem Papers, 2016, 70(11): 1445–1451.
- [14] Fai AEC, Silva JB, Andrade CJ, *et al.* Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri* [J]. Bioca Agric Biol, 2014, 3(4): 343–350.
- [15] Sen P, Nath A, Bhattacharjee C, *et al.* Process engineering studies of free and micro-encapsulated β -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides [J]. Biol Eng J, 2014, 90: 59–72.
- [16] Cruz-Guerrero AE, Gómez-Ruiz L, Viniegra-González G, *et al.* Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic beta-glycosidase in an organic medium [J]. Biot Bioen, 2006, 93(6): 1123–1129.
- [17] Srivastava A, Mishra S, Chand S. Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551 [J]. New Biotech, 2015, 32(4): 412–418.
- [18] Fischer C, Kleinschmidt T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate [J]. Int Dairy J, 2015, 48: 15–22.
- [19] Vera C, Guerrero C, Conejeros R, *et al.* Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose [J]. Enzyme Micro Technol, 2012, 50(3): 188–194.
- [20] Lu L, Xu S, Zhao R, *et al.* Synthesis of galactooligosaccharides by CBD fusion β -galactosidase immobilized on cellulose [J]. Bior Technol, 2012, 116: 327–333.
- [21] Guerrero C, Vera C, Illanes A. Optimisation of synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (fructosyl-galacto-oligosaccharides) with β -galactosidases of different origin [J]. Food Chem, 2013, 138(4): 2225–2232.
- [22] 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]. Eur Food Res Technol, 2013, 236(5): 817–826.
- [23] Guerrero C, Vera C, Acevedo F, *et al.* Simultaneous synthesis of mixtures of lactulose and galacto-oligosaccharides and their selective fermentation [J]. J Biotech, 2015, 209: 31–40.
- [24] Fai AEC, Simiqueli APR, Ghiselli G, *et al.* Sequential optimization approach for prebiotic galactooligosaccharides synthesis by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri* [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 63(2): 1214–1219.
- [25] Lisboa CR, Simoni ML, Trindade RA, *et al.* Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey [J]. Food Sci Biotech, 2012, 21(6): 1519–1524.
- [26] Gobinath D, Prapulla SG. Permeabilized probiotic *Lactobacillus plantarum* as a source of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides [J]. Biotech Lett, 2014, 36(1): 153–157.

- [27] Palai T, Bhattacharya PK. Kinetics of lactose conversion to galacto-oligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF membrane [J]. J Biosci Bioen, 2013, 115(6): 668–673.
- [28] Sangwan V, Tomar SK, Ali B, *et al.* Production of β -galactosidase from streptococcus thermophilus for galactooligosaccharides synthesis [J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(7): 4206–4215.
- [29] Gezgin Y, Eltem R. Production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from *Thermus oshimai* DSM 12092 [J]. New Biotech, 2012 (29): S129.
- [30] Urrutia P, Mateo C, Guisan JM, *et al.* Immobilization of *Bacillus circulans* β -galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation [J]. Biochem Eng J, 2013, 77: 41–48.
- [31] Manera AP, Zobot GL, Oliveira JV, *et al.* Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides using pressurised fluids as reaction medium [J]. Food Chem, 2012, 133(4): 1408–1413.
- [32] Rodríguez-Colinas B, Fernández-Arrojo L, Ballesteros AO, *et al.* Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk [J]. Food Chem, 2014, 145: 388–394.
- [33] Rastall RA. Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance [J]. J Nutr, 2004, 134(8): 2022–2026.
- [34] Splechtn B, Petzelbauer I, Baminger U, *et al.* Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid [J]. Enzy Microb Technol, 2001, 29: 434–440.
- [35] Iqbal S, Nguyen TH, Nguyen TT, *et al.* β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides [J]. Carbo Res, 2010, 345(10): 1408–1416.
- [36] Vénica CI, Bergamini CV, Rebecchi SR, *et al.* Galacto-oligosaccharides formation during manufacture of different varieties of yogurt. Stability through storage [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 63(1): 198–205.
- [37] Park AR, Oh DK. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: Current state and perspectives [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85: 1279–1286.
- [38] Klein MP, Fallavena LP, Schöffner JN, *et al.* High stability of immobilized β -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis [J]. Carbohy Poly, 2013, 95(1): 465–470.
- [39] Park HY, Kim HJ, Lee JK, *et al.* Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus* [J]. World J Microb Biotech, 2008, 24(8): 1553–1558.
- [40] Wu Y, Yuan S, Chen S, *et al.* Enhancing the production of galacto-oligosaccharides by mutagenesis of *Sulfolobus solfataricus* β -galactosidase [J]. Food Chem, 2013, 138(2–3): 1588–1595.
- [41] 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.
- [42] Otieno DO. Synthesis of β -Galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases [J]. Food Sci Food Saf, 2010, 9: 471–482.
- [43] Sarabia-Sainz HM, Armenta-Ruiz C, Sarabia-Sainz JA, *et al.* Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to neoglycans synthesised with prebiotic galactooligosaccharides [J]. Food Chem, 2013, 141(3): 2727–2734.
- [44] Pocedicova K, Germain B, Krausova J, *et al.* Preparation of galactooligosaccharides using crude cell extract from lactic acid bacteria [J]. J Biotech, 2010, (150): 329.
- [45] Osman A, Tzortzis G, Rastall RA, *et al.* A comprehensive investigation of the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 [J]. J Biotech, 2010, 150(1): 140–148.
- [46] Neri DFM, Balcão VM, Dourado FOQ, *et al.* Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane-polyaniline particles [J]. Rea Funct Poly, 2009, 69(4): 246–251.
- [47] Lamsal BP. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides [J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(10): 2020–2028.
- [48] Boehm G, Moro G. Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition [J]. J Nutr, 2008, 138: 1818–1828.
- [49] Palai T, Kumar A, Bhattacharya PK. Kinetic studies and model development for the formation of galacto-oligosaccharides from lactose using synthesized thermo-responsive bioconjugate [J]. Enzyme Micro Technol, 2015, 70: 42–49.
- [50] 陈亚东, 贾晓明, 喻文亮, 等. 配方奶添加低聚半乳糖改善婴儿肠道微生态和发酵的研究[J]. 现代医学, 2007, 35: 423–427.
- Chen YD, Ben XM, Yu WL, *et al.* Study on improving infant intestinal microflora and fermentation by adding galacto-oligosaccharides in formula [J]. Mod Med J, 2007, 35: 423–427.
- [51] 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.
- [52] 陈真真. β -半乳糖苷酶菌株筛选酶的分离纯化和性质及酶法合成低聚半乳糖的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- Chen ZZ. Screening of the strain producing β -galactosidase, purification and characterization of the enzyme and enzymatic synthesis of galactooligosaccharides [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



张金秋, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 526777442@qq.com



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