

双歧杆菌和乳酸菌 β -半乳糖苷酶转糖基作用的研究进展

姜陈波, 杭 锋*

(乳业生物技术国家重点实验室, 上海乳业生物工程技术研究中心, 光明乳业股份有限公司乳业研究院, 上海 200436)

摘 要: 双歧杆菌和乳酸菌作为一般认为安全的微生物, 是 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)的较好来源。部分双歧杆菌和乳酸菌菌株能够产生具有转糖基活力的 β -gal, 以乳糖为底物可合成具有益生作用的低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS), 而GOS产物的产量和组成受到 β -gal的来源以及反应条件的影响。因此, 本文总结了能够产生具有转糖基活力的 β -gal的双歧杆菌和乳酸菌菌株, 比较了两类来源的 β -gal的酶学性质, 并重点阐述了这两类 β -gal在GOS合成中的应用。

关键词: β -半乳糖苷酶; 乳酸菌; 双歧杆菌; 转糖基作用; 低聚半乳糖

Advances in Our Understanding of the Transgalactosylation Activity of β -Galactosidase from Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria

JIANG Chenbo, HANG Feng*

(State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai Engineering Research Centre of Dairy Biotechnology, Dairy Research Institute, Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China)

Abstract: Bifidobacteria and lactic acid bacteria are generally recognized as safe (GRAS) microorganisms and are good sources of β -galactosidase (β -gal). β -gal with transgalactosylation activity from some strains of bifidobacteria and lactic acid bacteria can be used to produce prebiotic galactooligosaccharides (GOS) with lactose as the substrate. However, the β -gal producer and reaction conditions have an impact on the yield and composition of GOS products. Therefore, this review summarizes bifidobacteria and lactic acid bacteria strains that can produce β -gal with transgalactosylation activity and compares the enzymatic properties of β -gal from both microbial sources. This review also sheds light on the application of β -gal in GOS synthesis.

Keywords: β -galactosidase; lactic acid bacteria; bifidobacteria; transgalactosylation; galactooligosaccharide

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180302-024

中图分类号: Q814.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2019)07-0335-07

引文格式:

姜陈波, 杭锋. 双歧杆菌和乳酸菌 β -半乳糖苷酶转糖基作用的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 335-341.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180302-024. <http://www.spkx.net.cn>

JIANG Chenbo, HANG Feng. Advances in our understanding of the transgalactosylation activity of β -galactosidase from bifidobacteria and lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2019, 40(7): 335-341. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180302-024. <http://www.spkx.net.cn>

半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)可作为生物催化剂水解乳糖, 广泛应用于乳品加工、食品加工、制药领域等^[1]。除了水解反应以外, 具有转糖基活力

的 β -gal还能参与转糖基反应, 产生益生元低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)^[2]。GOS因其具有显著调节肠道菌群、提高有益菌双歧杆菌的数量和代谢活

收稿日期: 2018-03-02

基金项目: 上海市科委项目(2016DZ2280600); 闵行区重大科技攻关项目(2015MH093)

第一作者简介: 姜陈波(1992—)(ORCID: 0000-0002-5004-3899), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: jiangchenbo@brightdairy.com

*通信作者简介: 杭锋(1982—)(ORCID: 0000-0002-6998-9211), 男, 高级工程师, 博士, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: fhang0427@126.com

力、减少有害菌吸附、调节肠道免疫系统以及治疗代谢疾病的作用,在益生元领域引起广泛关注^[3]。

商业GOS一般以乳糖为底物,通过 β -gal转糖基反应,产生具有不同聚合度和糖苷键的复杂GOS混合物,该过程依赖于酶的来源和作用条件^[4]。 β -gal在自然界中普遍存在,其来源包括动物、植物和微生物,一般而言微生物来源 β -gal的生产率更高,可以显著降低生产成本^[5]。因此,尽管在多种来源中发现 β -gal,仍普遍采用微生物源 β -gal合成GOS^[6]。微生物源 β -gal包括曲霉属(*Aspergillus*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)以及双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)等,这些来源的 β -gal已作为生物催化剂应用于GOS的合成反应^[7]。

在多种微生物源 β -gal中,*Aspergillus*和*Kluyveromyces*菌株产生的 β -gal在工业中应用范围最广^[8]。但双歧杆菌(*bifidobacteria*)和乳酸菌(*lactic acid bacteria*, LAB)来源的 β -gal在生产GOS方面也具有非常重要的价值,是 β -gal较好的来源,且越来越受到关注。首先双歧杆菌和LAB均被认为是“一般认为安全(generally recognized as safe, GRAS)”的微生物,在食品发酵领域具有较长的应用历史。此外,研究发现利用乳酸菌 β -半乳糖苷酶(*lactic acid bacteria* β -galactosidase, L β -gal)和双歧杆菌 β -半乳糖苷酶(*bifidobacteria* β -galactosidase, B β -gal)合成的GOS将最有可能选择性促进这两类菌在肠道中的生长,提高菌株在肠道内的代谢活力,从而增加益生作用^[9]。

近年来,国内关于 β -gal的综述性报道较少,国外则较为全面^[1,5],但针对L β -gal和B β -gal这两类来源及其合成GOS的总结报道较少。因此,本文针对L β -gal和B β -gal转糖基作用合成GOS的研究进展,总结了能够产生具有转糖基活力 β -gal的双歧杆菌和乳酸菌菌株,分析比较了两类来源的 β -gal的酶学性质,并重点阐明了 β -gal以乳糖为底物在合成GOS中的应用,为开发L β -gal和B β -gal及其应用提供理论指导。

1 β -gal转糖基作用合成GOS

近年来,GOS因其具有多种益生功能,且在较广的pH值和温度范围内具有稳定性,而受到广泛关注^[10]。GOS的分子链含有2~8个单糖,末端为1个葡萄糖分子,剩余部分为半乳糖;此外,通过转糖基作用由2个半乳糖组成的二糖也属于GOS^[6]。GOS被认为是具有有益作用的益生元成分,可不被水解或消化直接从人体上肠道到达大肠,选择性促进肠道中有益菌双歧杆菌和乳杆菌的生长,以及抑制肠道致病菌的生长^[11],从而改善肠道菌群的组成,对免疫反应和代谢综合征标志物产生积极

作用^[12-14]。此外,肠道微生物在结肠中发酵GOS的产物包括乙酸、丙酸、丁酸和乳酸等短链脂肪酸,这些产物给结肠上皮提供能量,降低了结肠pH值,促进了钙、镁的吸收,以及降低了促炎反应标志物的水平^[15-17]。

目前,主要通过糖苷水解酶的转糖基作用,以乳糖为底物,产生具有不同聚合度和结构的GOS混合物以及未参与反应的乳糖和单糖(葡萄糖和半乳糖)^[18]。在GOS的工业化生产中, β -gal发挥着极其重要的作用,其形成GOS的具体作用机制见图1。首先1分子乳糖和 β -gal的活性位点结合,释放葡萄糖残基,剩下的 β -gal-半乳糖基复合物进行下一步反应。接着,该复合物转移到含有羟基的糖类或水分子受体上,当溶液中乳糖浓度较低时,将促进水分子作为受体,产生半乳糖;而当溶液中乳糖浓度较高时,则乳糖等作为受体连接该复合物,最终产生GOS^[5]。当乳糖作为受体时,通过转糖基作用可产生聚合度为3的GOS(β -D-Galp-(1 \rightarrow x)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp),该GOS可再次作为受体底物,重复经历转糖基过程。因此,转糖基反应可产生具有不同结构的GOS混合物^[3]。

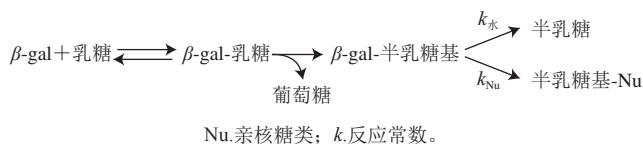


图1 β -gal合成GOS的反应^[5]

Fig. 1 Reaction route for the synthesis of GOS by β -gal^[5]

2 具有转糖基活力L β -gal和B β -gal的来源和酶学性质

2.1 具有转糖基活力L β -gal和B β -gal的来源

部分双歧杆菌和LAB菌株能够产生具有转糖基活力的 β -gal,这两类菌是筛选转糖基活力 β -gal的较好来源^[9]。表1总结了目前文献报道的具有转糖基活力L β -gal和B β -gal的来源。其中,能够产生具有转糖基活力 β -gal的双歧杆菌包括长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*)、婴儿长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、角形双歧杆菌(*Bifidobacterium angulatum*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)和假长双歧杆菌(*Bifidobacterium pseudolongum*)等。L β -gal的来源包括嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)

subsp. *bulgaricus*)、罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 和副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 等。

β -gal主要以全细胞、经过化学处理或物理处理的细胞、破碎细胞后获得的粗酶、粗酶经过进一步纯化获得的纯化酶、固定化处理的酶, 以及通过大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、巴氏毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和 *L. plantarum* 等表达宿主菌获得的重组酶等不同形式存在。不同来源和不同形式的 β -gal的酶学性质存在差异, 从而对GOS的合成过程产生影响。

表1 $L\beta$ -gal和 $B\beta$ -gal的来源
Table 1 Microbial sources of $L\beta$ -gal and $B\beta$ -gal

酶来源	形式	表达宿主菌	处理方式	参考文献
<i>B. longum</i> RD47	重组酶	<i>E. coli</i>	超声破碎细胞, 离心后纯化上清液	[15]
<i>B. breve</i> DSM20213	重组酶	<i>E. coli</i>	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 离心后纯化上清液	[19]
<i>B. breve</i> B24	重组酶	<i>E. coli</i>	超声破碎细胞, 离心后纯化上清液	[20]
<i>B. bifidum</i> NCIMB41171	全细胞	—	未处理	[21]
<i>B. bifidum</i> NCIMB41171	重组酶	<i>E. coli</i>	超声破碎细胞, 离心后纯化上清液	[7]
<i>B. bifidum</i> BB-12	粗酶	—	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 获得粗酶	[22]
<i>B. infantis</i> HL96	重组酶	<i>P. pastoris</i>	超声破碎细胞, 离心后获得粗酶	[23]
<i>B. infantis</i> DSM-20088	粗酶	—	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 获得粗酶	[22]
<i>B. adolescentis</i> ANB-7	粗酶	—	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 获得粗酶	[22]
<i>B. angulatum</i>	粗酶	—	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 获得粗酶	[22]
<i>B. pseudolongum</i> DSM-20099	粗酶	—	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 获得粗酶	[22]
<i>S. thermophilus</i> DSM20259	重组酶	<i>L. plantarum</i>	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 离心获得粗酶	[24]
<i>S. thermophilus</i> ST61	粗酶	—	十二烷基硫酸钠-氯仿37℃处理细胞悬浮液5 min	[10]
<i>L. pentosus</i> KUB-ST10-1	纯化酶	—	均质处理破碎细胞, 离心后纯化上清液	[25]
<i>L. plantarum</i> MCC2156	渗透化细胞	—	乙醇、 <i>n</i> -丁醇28℃处理细胞悬浮液20 min	[26]
<i>L. plantarum</i> 70810	超声处理细胞	—	溶菌酶37℃处理3 h后, 超声处理	[27]
<i>L. brevis</i> PLA28	纯化酶	—	均质处理破碎细胞, 离心后纯化上清液	[28]
<i>L. bulgaricus</i> DSM20081	重组酶	<i>L. plantarum</i>	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 离心后纯化上清液	[29]
<i>L. fermentum</i> K4	重组酶	<i>E. coli</i>	超声破碎细胞, 离心后纯化上清液	[30]
<i>L. sakei</i> Lb790	重组酶	<i>E. coli</i>	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 离心后纯化上清液	[31]
<i>L. acidophilus</i> R22	纯化酶	—	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 离心后纯化上清液	[32]
<i>L. reuteri</i> L103	纯化酶	—	弗氏细胞破碎机破碎细胞, 离心后纯化上清液	[33]
<i>L. paracasei</i> YSM0308	粗酶	—	溶菌酶37℃处理60 min后, 超声处理	[34]

注: —. 无表达宿主菌。

2.2 具有转糖基作用的 $L\beta$ -gal和 $B\beta$ -gal的酶学性质

基于CAZy (carbohydrate-active enzymes) 数据库, β -gal属于糖苷水解酶家族 (glycoside hydrolase families, GH) 1、2、35、42和59 (GH1、GH2、GH35、GH42和GH59) [35]。双歧杆菌和乳酸菌中, 仅在GH2和GH42家族中发现具有转糖基活力的 β -gal (表2)。GH2家族中, 大部分乳酸菌产生LacLM类型的 β -gal, 即由*lacL*和*lacM*两个基因编码形成的异源二聚体, 包括*L. pentosus* KUB-ST10-1、*L. acidophilus* R22、*L. plantarum* WCFS1、*L. sakei* Lb790、*L. reuteri* L103等菌株[25]。而由单一*lacZ*基因编码的LacZ类型 β -gal在乳酸菌中不常见, 仅有少数乳酸菌属于这一类型, 例如菌株*L. bulgaricus* DSM20081[29]。LacZ类型的 β -gal在双歧杆菌中更为常见, 例如*B. bifidum* NCIMB 41171、*B. infantis* HL96、*B. breve* DSM 20213和*B. longum* CCRC 15708等双歧杆菌

菌株产生的 β -gal均为LacZ类型[19,29-30]。此外, 具有转糖基活力的 $L\beta$ -gal和 $B\beta$ -gal以GH2家族居多, 只有少部分菌株属于GH42家族, 例如分别来自*B. bifidum* NCIMB 41171的 β -半乳糖苷酶BbgII[36]和*B. infantis* HL96的 β -半乳糖苷酶 β -GalIII[37]。这是由于GH2家族的 β -gal可能更倾向于催化转糖基反应, 因此该家族 β -gal转糖基活力的研究一般得到更多关注[19]。

β -gal催化合成GOS是一个动力学控制的反应, 该过程转糖基反应和水解反应同时发生[6]。但关于GOS合成反应的动力学参数米氏常数 K_m 以及催化常数 k_{cat} 的报道较少, 这可能是由于GOS的形成速率很难准确计算。当 K_m 用来计算转糖基作用时, 通常需要的数量级远高于乳糖水解的数量级, 例如*B. bifidum* β -gal的转糖基作用和乳糖水解的乳糖浓度分别为800 mmol/L和13 mmol/L, 转糖基作用需要提供更高的乳糖浓度才能获得最大转糖基速率[38]。因此, 相比于转糖基作用的动力学参数, 关于乳糖水解的动力学参数报道更多, 表2总结了具有转糖基活力的 $L\beta$ -gal和 $B\beta$ -gal的乳糖水解的动力学参数以及 β -gal参与乳糖水解反应的最适pH值和温度。

表2 $L\beta$ -gal和 $B\beta$ -gal的酶学性质
Table 2 Enzymatic properties of $L\beta$ -gal and $B\beta$ -gal

酶来源	家族	分子量/kDa	分类	最适pH	最适温度/℃	K_m /(mmol/L)	k_{cat}/s^{-1}	参考文献
<i>B. breve</i> DSM 20213 β -gal I	GH2	220	同源二聚体	7.0	50	15.3	114	[19]
<i>B. breve</i> DSM 20213 β -gal II	GH2	211	同源二聚体	6.5	55	7.5	188	[19]
<i>B. infantis</i> HL96 β -GalI	GH2	470	四聚体	7.5	50	73.8	—	[39]
<i>B. bifidum</i> NCIMB 41171 BbgIV	GH2	248	同源二聚体	6.4~6.8	50	1.5	603.2	[36]
<i>B. bifidum</i> NCIMB 41171 BbgII	GH42	178	同源二聚体	5.4~5.8	40	47.1	69.8	[36]
<i>L. bulgaricus</i> DSM20081	GH2	200	同源二聚体	7.5	55~60	19.2	234	[29]
<i>L. sakei</i> Lb790	GH2	110	异源二聚体	7.5	55	20	43	[31]
<i>L. pentosus</i> KUB-ST10-1	GH2	105	异源二聚体	8.0	60~65	38	20	[25]
<i>L. plantarum</i> WCFS1	GH2	107	异源二聚体	7.0	60	29	98	[40]
<i>L. acidophilus</i> R22	GH2	105	异源二聚体	6.5~8.0	55	4.04	50.4	[32]
<i>L. reuteri</i> L103	GH2	108	异源二聚体	8.0	50~60	12	—	[41]

注: —. 文献未说明。

3 $L\beta$ -gal和 $B\beta$ -gal合成GOS的应用

3.1 产生的GOS特点

β -gal的来源可能是影响GOS合成最重要的因素, 决定了GOS的产量、产物的组成以及 β -糖苷键的类型[11]。

3.1.1 GOS产量

在文献中关于GOS的产量有多种定义, 较常用的定义是GOS质量浓度 (g/L) 和初始乳糖质量浓度 (g/L) 的比值[15], 在本文中即采用该定义表达GOS产量。表3列举了不同来源的 $L\beta$ -gal和 $B\beta$ -gal, 以乳糖为底物合成GOS的反应条件和最大产量。由表3可知, 在不同的过程参数下, 源自不同菌株的 $L\beta$ -gal和 $B\beta$ -gal转糖基作用产生GOS的量在10%~70%之间不等。一般而言, GOS产

量超过50%的 β -gal较不常见，合成过程经过优化后，获得的产量约在30%~40%之间^[24]。表3中总结了目前报道的几个GOS产量超过50%的B β -gal和L β -gal，例如，源自*B. infantis* HL96菌株的 β -galI，合成的GOS产量达到63%^[39]。*B. bifidum* NCIMB41171 β -gal无论是存在于完整的细胞中，还是以重组酶BbgIV形式存在，其GOS产量均超过50%^[9]。在乳酸菌中，*S. thermophilus* DSM20259^[24]和*L. bulgaricus* DSM20081^[29]菌株产生的 β -gal，合成的GOS产量达到50%左右，是乳酸菌中GOS产量较高的菌株。但也存在GOS产量较低的 β -gal，例如*L. pentosus* BFP32 β -gal合成的GOS产量较低，当以粗酶液作为催化剂，GOS产量仅为13.9%^[42]。L β -gal和B β -gal转糖基活性存在菌株特异性，其中部分 β -gal合成GOS的产量甚至超过60%，高于*Aspergillus* β -gal和*Kluyveromyces* β -gal等常见来源^[43]，因此可以深入探究这两类来源的 β -gal的特点，并应用于GOS的工业生产。

表3 L β -gal和B β -gal不同反应条件下的最大GOS产量

Table 3 Maximum GOS yield produced by L β -gal and B β -gal under different reaction conditions						
酶来源	形式	pH	温度/℃	初始乳糖水平	GOS产量/%	参考文献
<i>B. logum</i> BCRC 15708	粗酶	6.8	45	400 g/L	32.5	[44]
<i>B. breve</i> B24	重组酶	7.0	45	342 g/L	42	[20]
<i>B. breve</i> DSM20213	重组酶 β -gal I	6.5	30	200 g/L	33	[19]
<i>B. breve</i> DSM20213	重组酶 β -gal II	6.5	30	200 g/L	44	[19]
<i>B. bifidum</i> NCIMB41171	重组酶BbgIV	6.8	65	质量分数43%	54.8	[9]
<i>B. bifidum</i> NCIMB41171	完整细胞	6.8	65	质量分数43%	52.2	[9]
<i>B. infantis</i> HL96	重组酶 β -galI	7.5	60	300 g/L	63	[39]
<i>B. pseudolongum</i> DSM-20099	粗酶	7.5	55	质量分数30%	26.8	[22]
<i>B. angulatum</i>	粗酶	7.5	55	质量分数30%	43.8	[22]
<i>B. infantis</i> DSM-20088	粗酶	7.5	55	质量分数30%	47.6	[22]
<i>B. adolescentis</i> ANB-7	粗酶	7.5	55	质量分数30%	43.1	[22]
<i>B. bifidum</i> BB-12	粗酶	7.5	55	质量分数30%	37.6	[22]
<i>L. bulgaricus</i> DSM20081	重组酶	6.5	30	205 g/L	49.5	[29]
<i>S. thermophilus</i> DSM20259	重组酶	6.5	37	205 g/L	50	[24]
<i>L. pentosus</i> BFP32	粗酶	7.0	50	质量分数60%	13.9	[42]
<i>L. plantarum</i> MCC2156	渗透化细胞	7.0	50	400 g/L	34	[45]
<i>L. plantarum</i> 70810	超声处理细胞	7.0	45	400 g/L	44.3	[27]
<i>L. plantarum</i> WCFS1	重组酶	6.5	37	205 g/L	41	[40]
<i>L. sakei</i> Lb790	重组酶	6.5	37	215 g/L	41	[31]
<i>L. acidophilus</i> R22	纯化酶	6.5	30	205 g/L	38.5	[32]
<i>L. reuteri</i> L103	纯化酶	6.5	30	205 g/L	38	[33]

3.1.2 GOS组成及链接方式

L β -gal和B β -gal以乳糖为底物合成的GOS结构为Gal_n-Lac；此外，也存在Gal-Gal的二糖结构（表4）。产物GOS的聚合度普遍在2~5之间。例如，*L. acidophilus* R22 β -gal合成的GOS中非乳糖二糖、三糖和四糖分别占总糖质量的15.5%、19%和4%^[32]。*L. plantarum* WCFS1 β -gal的GOS产物中非乳糖二糖、三糖和四糖的占比分别为19%、21%和1.3%^[40]。*B. bifidum* NCIMB 41171 β -gal合成的GOS混合物，除了含有二糖（25%）、三糖

（35%）、四糖（25%），还有15%的戊糖^[21]。

商业GOS例如Elix'or的糖苷键类型主要为 β -1,4糖苷键，和L β -gal合成的GOS存在较大的区别^[40]。表4总结了不同来源L β -gal和B β -gal合成的GOS产物的组成和链接方式。L β -gal倾向于合成 β -1,6和 β -1,3糖苷键连接的GOS。其中这几株LAB菌株，包括*L. bulgaricus* DSM20081^[29]、*L. reuteri* L103^[33]、*L. plantarum* WCFS1^[40]和*L. sakei* LB790^[31]产生的L β -gal尤其倾向于合成 β -1,6糖苷键连接的GOS；此外，在双歧杆菌中也存在类似现象，将*B. breve* DSM 20213菌株中的*lacZ*基因在*E. coli*中表达，获得两种纯化后的重组酶 β -gal I和 β -gal II，两种酶通过转糖基作用产生的主要GOS产物为二糖 β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Glc和三糖 β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Lac，都是通过 β -1,6和 β -1,3糖苷键连接的，两种糖的总量分别超过GOS总量的75%和65%，而通过其他糖苷键连接的GOS产物则较少，仅产生极少量 β -1,4糖苷键连接的三糖 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Lac^[19]。但B β -gal产物中也存在主要通过 β -1,4糖苷键连接的GOS产物，例如*B. longum* RD47菌株 β -gal合成的三糖和四糖中，均存在 β -1,4糖苷键^[15]。相比于L β -gal，B β -gal合成的GOS糖苷键类型更具多样化。

表4 L β -gal和B β -gal产生的GOS结构特点

Table 4 Structural characteristics of GOS produced by L β -gal and B β -gal			
酶来源	聚合度	糖苷键连接方式	参考文献
<i>B. longum</i>	3和4	聚合度为3时，连接方式为：Gal(β 1'4)-Lac；聚合度为4时，连接方式为：Gal(β 1'4)-Gal(β 1'4)-Lac	[15]
<i>B. breve</i>	2和3	聚合度为2时，连接方式为：Gal(β 1'6)-Glc、Gal(β 1'3)-Glc、Gal(β 1'3)-Gal、Gal(β 1'6)-Gal；聚合度为3时，连接方式为：Gal(β 1'3)-Lac、Gal(β 1'6)-Lac、Gal(β 1'4)-Lac	[19]
<i>B. bifidum</i>	3、4和5	聚合度为3时，连接方式为：Gal(β 1'3)-Lac、Gal(β 1'6)-Lac；聚合度为4时，连接方式为：Gal(β 1'6)-Gal(β 1'6)-Lac；聚合度为5时，连接方式为：Gal(β 1'6)-Gal(β 1'6)-Gal(β 1'6)-Lac	[43]
<i>L. Pentosus</i> , <i>S. Thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i>	2和3	聚合度为2时，连接方式为：Gal(β 1'6)-Glc、Gal(β 1'3)-Glc、Gal(β 1'3)-Gal、Gal(β 1'6)-Gal；聚合度为3时，连接方式为：Gal(β 1'3)-Lac、Gal(β 1'6)-Lac	[24-25,29,31-33,40]

注：Gal.半乳糖（galactose）；Glc.葡萄糖（glucose）。

3.2 影响GOS合成反应的因素

β -gal的来源是影响GOS合成最重要的变量，决定了GOS的产量、产物的组成以及 β -糖苷键的类型。除此之外，酶的形式、反应条件等也会影响GOS的合成^[46-47]。本文重点从反应时间、乳糖浓度、反应温度、热稳定性酶的应用、固定化酶这5个方面，分析总结影响GOS合成反应的因素。

3.2.1 反应时间

β -gal以乳糖为底物合成GOS的反应过程中，GOS的合成和降解反应同时进行，GOS产量和组成不断发生变化，因此需要了解反应时间历程（乳糖转化）以获得最大的GOS产量^[18]。*L. bulgaricus* DSM20081 β -gal

在合成GOS过程中,反应开始时主要形成三糖,包括 β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Lac和 β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Lac。随着反应的进行,葡萄糖和半乳糖的量稳定增加,这部分单糖成为转糖基反应的重要受体,部分非乳糖二糖开始形成,例如 β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Glc和 β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Glc是该阶段两种主要产物。反应过程中GOS产量也随着时间延长不断发生变化,当反应时间为12 h时,GOS的产量最高,接近50%,但在此之后,由于 β -gal也能够水解GOS,GOS浓度出现下降,反应时间达到24 h时,GOS产量约降低了10%^[29]。*B. breve* DSM20213 β -gal I和 β -gal II两种酶在合成GOS时,分别在6 h和22 h之后获得最大GOS产量,但之后GOS浓度也出现了下降,尤其是 β -gal I更为显著^[19]。因此,终止反应的时间点相当严格,要尽可能接近最大GOS产量的时间点,以降低GOS的损失。

3.2.2 乳糖浓度

一般情况下,增加初始乳糖浓度有利于GOS的合成。初始乳糖浓度对GOS合成过程的影响主要表现在两个方面:一方面增加了半乳糖基受体数量,提高了GOS的合成速率;另一方面降低了水分活度,从而降低了GOS的降解速率以及乳糖水解速率^[38]。但当初始乳糖浓度过高时,GOS的产量出现下降。例如,利用*L. plantarum* 79810菌株的 β -gal合成GOS时,当初始乳糖质量浓度从200 g/L升高到400 g/L时,反应体系中转糖基反应逐渐占据主体,但随着乳糖质量浓度的进一步增加,GOS产量减少^[27]。*B. longum* BCRC 15708菌株的 β -gal催化反应中,当乳糖初始质量浓度从50 g/L增加到400 g/L时,GOS产量不断增加,质量浓度为400 g/L时,产量最高,但随着乳糖质量浓度进一步增加,GOS产量出现减少,与*L. plantarum* 79810菌株的反应趋势一致^[44]。而出现该现象的原因,可能是由于高浓度乳糖底物,伴随着高含量半乳糖和葡萄糖转糖基产物的产生,而这两种产物是 β -gal的竞争性抑制剂,从而降低了GOS的合成^[27]。因此,在一定范围内提高初始乳糖浓度有利于提高GOS产量。

3.2.3 反应温度

提高温度有利于促进GOS的合成,主要原因是由于温度的升高增加了反应速率和底物的溶解度。例如,Geiger等^[24]将*S. thermophilus* DSM20259菌株中编码 β -gal的lacZ基因,在*L. plantarum*中表达获得重组 β -gal粗酶提取液后,分别在37℃和50℃条件下合成GOS,在50℃条件下反应5 h,GOS产量接近总糖的50%;当反应温度降低到37℃时,需要反应8.5 h才能达到50%的产量。但不同来源 β -gal的适宜反应温度范围具有菌株特异性,Zhang Hongzhi等^[27]以超声破碎处理后的*L. plantarum* 79810菌株作为 β -gal源合成GOS,当反应温度分别为30、37、45℃和50℃时,GOS的最高产量分别为26.5%、36.8%、

43.5%和15.6%;当温度从30℃升高到45℃时,乳糖转化率从46.85%升高到78.25%,GOS产量逐渐增加;但随着温度从45℃升高到50℃,GOS产量出现显著下降。此外,温度可能对GOS产量无显著影响。Nguyen等^[29]利用*L. bulgaricus*的 β -gal合成GOS时,反应温度对GOS产物的最大产量以及组成影响很小,温度为30、40、50℃时,产量分别为49.5%、48.7%、48.2%;GOS混合物的主要组成成分未发生改变,且产量只发生微量变化。因此,针对不同来源的 β -gal,需探究适宜的反应温度以提高GOS产量。

3.2.4 热稳定性酶的应用

升高温度通常能够促进GOS产生,但 β -gal的热稳定性可能限制其在工业化规模上的应用;因此许多学者针对热稳定性酶的来源和特性展开重点研究^[48-49]。热稳定性 β -gal在应用时,提高反应温度、增加初始反应乳糖浓度,不仅可提高GOS产量,同时能够限制其他微生物的污染^[38]。目前普遍认为,来自嗜热微生物的 β -gal在较高温度下转糖基活力较高,是适于合成GOS的生物催化剂;而来自乳酸菌和双歧杆菌的 β -gal合成GOS的反应温度一般不超过55℃。然而,Osman等^[9]首次在双歧杆菌*B. bifidum* NCIMB 41171菌株中分离纯化出一种 β -半乳糖苷酶BbgIV,它能够在65℃条件下有效合成GOS,最大GOS产量达到54.8%,高于一般水平。GOS生产率在65℃条件下达到35.1 g/(L·h),远高于生产率分别为4.8、12.7、24.3 g/(L·h)和18.2 g/(L·h)的菌株布勒掷孢酵母(*Bullera singularis*)、*B. infantis* HL96、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*);该发现实现了B β -gal在65℃高温下合成GOS的可能,说明B β -gal在合成GOS方面具有很大的潜力。

3.2.5 酶的固定化处理

除了筛选热稳定性强的L β -gal和B β -gal以外,酶的固定化处理也可提高 β -gal的稳定性。固定化处理是将酶限制在一定区域内,保留催化活力,从而增加酶的稳定性和可重复利用性,其核心的技术问题在于载体材料的制备与选择^[50]。关于B β -gal的固定化研究较少,Osman等^[47]首次将*B. bifidum* NCIMB41171菌株产生的 β -半乳糖苷酶BbgIV固定化处理后合成GOS,相比于游离的BbgIV,DEAE纤维素、Q-琼脂糖凝胶和氨基乙基琼脂糖固定化BbgIV在45℃和55℃下稳定性提高;其中,Q-琼脂糖凝胶固定化BbgIV在45℃和55℃下反应仅2 h即获得最大产量的GOS(49%~53%),而游离BbgIV合成最大产量GOS(49%~53%)则分别需要20 h和16 h;此外,Q-琼脂糖凝胶固定化BbgIV在55℃高温下重复使用6次后,活力仍保留了67.5%。因此,固定化处理也将会对GOS合成成本产生重要的影响。

4 结 语

双歧杆菌和乳酸菌被认为是GRAS微生物,是 β -gal较好的来源,在生产GOS方面具有非常重要的价值。目前,Clasado公司利用*B. bifidum* NCIMB41171菌株产生的GOS已经实现商业化生产,GOS质量分数达到48%^[51]。此外,*S. thermophilus*菌株产生的 β -gal在将乳清中的乳糖转化为GOS方面也有较好的应用^[24]。

β -gal的来源和反应条件等影响GOS的类型、产量以及特殊糖苷键的形成。未来的研究方向,一方面需要进一步筛选转糖基活力高的L β -gal和B β -gal,充分利用高乳糖含量的乳清等乳制品工业废弃物,优化反应过程,提高GOS产量和纯度,从而减少乳清等对环境的污染,增加经济效益^[52];另一方面,在婴儿配方粉中通常添加GOS模拟母乳寡糖的结构和益生作用,但GOS结构的多样性显著低于母乳寡糖^[3,53]。因此需要深入探究L β -gal和B β -gal酶学性质和产生的GOS特点,通过结构定点饱和和诱变等生物工程技术,丰富GOS结构的多样性,从而扩大工业化应用。

参考文献:

- [1] NATH A, MONDAL S, CHAKRABORTY S, et al. Production, purification, characterization, immobilization, and application of β -galactosidase: a review[J]. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering, 2014, 9(3): 330-348. DOI:10.1002/apj.1801.
- [2] NIVETHA A, MOHANASRINIVASAN V. Mini review on role of β -galactosidase in lactose intolerance[J]. Materials Science and Engineering, 2017, 263(2): 1-6. DOI:10.1088/1757-899X/263/2/022046.
- [3] YIN H F, PIJNING T, MENG X F, et al. Engineering of the *Bacillus circulans* β -galactosidase product specificity[J]. Biochemistry, 2017, 56(5): 704-711. DOI:10.1021/acs.biochem.7b00032.
- [4] WICHENCHOT S, HEMMARATCHIRAKUL J, JATURAPIREE P, et al. Evaluating prebiotic property of galactooligosaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* 3BFP32 in fecal batch culture[J]. International Food Research Journal, 2016, 23(5): 2241-2248.
- [5] SAQIB S, AKRAM A, HALIM S A, et al. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry[J]. Biotech, 2017, 7(1): 1-7. DOI:10.1007/s13205-017-0645-5.
- [6] VERA C, GUERRERO C, ILLANES A, et al. Fed-batch synthesis of galacto-oligosaccharides with *Aspergillus oryzae* β -galactosidase using optimal control strategy[J]. Biotechnology Progress, 2014, 30(1): 59-67. DOI:10.1002/btpr.1831.
- [7] OSMAN A, TZORTZIS G, RASTALL R A, et al. High yield production of a soluble bifidobacterial galactosidase (BbgIV) in *E. coli* DH5 with improved catalytic efficiency for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(9): 2213-2223. DOI:10.1021/jf304792g.
- [8] ANSARI S A, SATAR R. Recombinant β -galactosidases-past, present and future: a mini review[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012, 81: 1-6. DOI:10.1016/j.molcatb.2012.04.012.
- [9] OSMAN A, TZORTZIS G, RASTALL R A, et al. BbgIV is an important *Bifidobacterium* β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides at high temperatures[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(3): 740-748. DOI:10.1021/jf204719w.
- [10] SANGWAN V, TOMAR S K, ALI B, et al. Production of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* for galactooligosaccharides synthesis[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(7): 4206-4215. DOI:10.1007/s13197-014-1486-4.
- [11] VERA C, CORDOVA A, ABURTO C, et al. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(12): 197. DOI:10.1007/s11274-016-2159-4.
- [12] VULEVIC J, JURIC A, WALTON G E, et al. Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons[J]. British Journal of Nutrition, 2015, 114(4): 586-595. DOI:10.1017/S0007114515001889.
- [13] VULEVIC J, JURIC A, TZORTZIS G, et al. A mixture of *trans*-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults[J]. Journal of Nutrition, 2013, 143(3): 324-331. DOI:10.3945/jn.112.166132.
- [14] 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(1): 81-87. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.026.
- [15] OH S Y, YOUN S Y, PARK M S, et al. Synthesis of β -galactooligosaccharide using bifidobacterial β -galactosidase purified from recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(8): 1392-1400. DOI:10.4014/jmb.1702.02058.
- [16] LI Z P, JIN H, OH S Y, et al. Anti-obese effects of two *Lactobacilli* and two *Bifidobacteria* on ICR mice fed on a high fat diet[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 480(2): 222-227. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.10.031.
- [17] IRAPORDA C, ERREA A, ROMANIN D E, et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells[J]. Immunobiology, 2015, 220(10): 1161-1169. DOI:10.1016/j.imbio.2015.06.004.
- [18] TORRES D P M, GONÇALVES M D P F, TEIXEIRA J A, et al. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010, 9(5): 438-454. DOI:10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x.
- [19] ARREOLA S L, INTANON M, SULJIC J, et al. Two β -galactosidases from the human isolate *Bifidobacterium breve* DSM 20213: molecular cloning and expression, biochemical characterization and synthesis of galacto-oligosaccharides[J]. PLoS ONE, 2014, 9(8): e104056. DOI:10.1371/journal.pone.0104056.
- [20] YI S H, ALLI I, PARK K H, et al. Overexpression and characterization of a novel transgalactosylase and hydrolytic β -galactosidase from a human isolate *Bifidobacterium breve* B24[J]. New Biotechnology, 2011, 28(6): 806-813. DOI:10.1016/j.nbt.2011.07.006.
- [21] 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(3): 412-416. DOI:10.1007/s00253-005-1919-0.
- [22] RABIU B A, JAY A J, GIBSON G R, et al. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2526-2530. DOI:10.1128/AEM.67.6.2526-2530.2001.

- [23] JUNG S J, LEE B H. Production and application of galacto-oligosaccharides from lactose by a recombinant β -galactosidase of *Bifidobacterium infantis* overproduced by *Pichia pastoris*[J]. Food Science and Biotechnology, 2008, 17(3): 514-518.
- [24] GEIGER B, NGUYEN H M, WENIG S, et al. From by-product to valuable components: efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2016, 116: 45-53. DOI:10.1016/j.bej.2016.04.003.
- [25] 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(8): 838-847. DOI:10.1002/biot.201000126.
- [26] GOBINATH D, PRAPULLA S G. Transgalactosylating β -galactosidase from probiotic *Lactobacillus plantarum* MCC2156: production and permeabilization for use as whole cell biocatalyst[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(9): 6003-6009. DOI:10.1007/s13197-014-1656-4.
- [27] ZHANG Hongzhi, LI Wei, RUI Xin, 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. DOI:10.1007/s00217-013-1938-5.
- [28] BHALLA T C, DEVI A, ANGMO K, et al. β -Galactosidase from *Lactobacillus brevis* PLA28: purification, characterization and synthesis of galacto-oligosaccharides[J]. Journal of Food and Industrial Microbiology, 2015, 1: 1-5. DOI:10.4172/jfim.1000104.
- [29] NGUYEN T T, NGUYEN H A, ARREOLA S L, et al. Homodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: expression in *Lactobacillus plantarum* and biochemical characterization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(7): 1713-1721. DOI:10.1021/jf203909e.
- [30] LIU G X, KONG J, LU W W, et al. β -Galactosidase with transgalactosylation activity from *Lactobacillus fermentum* K4[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(12): 5811-5820. DOI:10.3168/jds.2011-4479.
- [31] IQBAL S, NGUYEN T H, NGUYEN H 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(8): 3803-3811. DOI:10.1021/jf103832q.
- [32] NGUYEN T H, SPLECHTNA B, KRASTEVA S, et al. Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 269(1): 136-144. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00614.x.
- [33] SPLECHTNA B, NGUYEN T H, STEINBÖCK 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(14): 4999-5006. DOI:10.1021/jf053127m.
- [34] SONG T S, LEE K S, KANG S B, et al. Synthesis of galactooligosaccharides in the cheese whey-based medium by a lactase from *Lactobacillus paracasei* YSM0308[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2013, 33(5): 565-571. DOI:10.5851/kosfa.2013.33.5.565.
- [35] ILIEV I N, MARUDOVA M G, CHOLEV D S, et al. Kinetic studies of β -galactosidase immobilized in chitosan/xanthan multilayers[J]. Bulgarian Chemical Communications, 2016, 48: 354-358.
- [36] GOULAS T, GOULAS A, TZORTZIS G, et al. Comparative analysis of four β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171: purification and biochemical characterisation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(6): 1079-1088. DOI:10.1007/s00253-008-1795-5.
- [37] HUNG M N, XIA Z, HU N T, et al. Molecular and biochemical analysis of two beta-galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4256-4263. DOI:10.1128/AEM.67.9.4256-4263.2001.
- [38] GOSLING A, STEVENS G W, BARBER A R, et al. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 307-318. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.12.063.
- [39] HUNG M N, LEE B H. Purification and characterization of a recombinant beta-galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(4): 439-445. DOI:10.1007/s00253-001-0911-6.
- [40] IQBAL 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(10): 1408-1416. DOI:10.1016/j.carres.2010.03.028.
- [41] NGUYEN T H, SPLECHTNA B, YAMABHAI M, et al. Cloning and expression of the beta-galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129(4): 581-591. DOI:10.1016/j.jbiotec.2007.01.034.
- [42] HEMMARATCHIRAKUL J, JATURAPIREE P, PRUEKSASRI S, et al. Production of galactooligosaccharide by β -galactosidase from *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* BFP32[J]. International Food Research Journal, 2015, 22(6): 2550-2557.
- [43] OTIENO D O. Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010, 9(5): 471-482. DOI:10.1111/j.1541-4337.2010.00121.x.
- [44] HSU C A, LEE S L, CHOU C C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2225-2230. DOI:10.1021/jf063126+.
- [45] GOBINATH D, PRAPULLA S G. Permeabilized probiotic *Lactobacillus plantarum* as a source of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(1): 153-157. DOI:10.1007/s10529-013-1345-9.
- [46] ARREOLA S L, INTANON M, WONGPUTTISIN P, et al. Transferase activity of lactobacillal and bifidobacterial β -galactosidases with various sugars as galactosyl acceptors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(12): 2604-2611. DOI:10.1021/acs.jafc.5b06009.
- [47] OSMAN A, SYMEOU S, TRISSE V, et al. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using bifidobacterial β -galactosidase (BbgIV) immobilised on DEAE-Cellulose, Q-Sepharose and amino-ethyl agarose[J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 82: 188-199. DOI:10.1016/j.bej.2013.11.020.
- [48] DING H T, ZENG Q, ZHOU L L, et al. Biochemical and structural insights into a novel thermostable β -1,3-galactosidase from *Marinomonas* sp. BSi20414[J]. Marine Drugs, 2017, 15(1): 1-15. DOI:10.3390/md15010013.
- [49] BEKLER F M, YALAZ S, ACER Ö, et al. Purification of thermostable β -galactosidase from *Anoxybacillus* sp. KP1 and estimation of combined effect of some chemicals on enzyme activity using semiparametric errors in variables model[J]. Fresenius Environmental Bulletin, 2017, 26(3): 2251-2259.
- [50] PAVEL I A, PRAZERES S F, MONTALVO G, et al. Effect of meso vs macro size of hierarchical porous silica on the adsorption and activity of immobilized β -galactosidase[J]. Langmuir, 2017, 33(13): 3333-3340. DOI:10.1021/acs.langmuir.7b00134.
- [51] SILK D B A, DAVIS A, VULEVIC J, et al. Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome[J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2009, 29(5): 508-518. DOI:10.1111/j.1365-2036.2008.03911.x.
- [52] FISCHER C, KLEINSCHMIDT T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate[J]. International Dairy Journal, 2015, 48: 15-22. DOI:10.1016/j.idairyj.2015.01.003.
- [53] BERTELSEN R J, JENSEN E T, RINGEL-KULKA T. Use of probiotics and prebiotics in infant feeding[J]. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, 2016, 30(1): 39-48. DOI:10.1016/j.bpg.2016.01.001.