

微生物酶法合成低聚半乳糖的新进展

卢丽丽, 李正义, 肖敏*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250100)

摘要: 低聚半乳糖(GOS)是目前国际上已开发的功能性低聚糖之一, 其商业化产品是应用微生物 β -半乳糖苷酶以乳糖为原料进行转糖基反应获得, 不同来源的酶合成 GOS 的结构不同, 转糖基效率也存在差异。天然酶合成 GOS 的产量一般为 20%~45%, 分子改造获得的人工酶能将 90%的乳糖底物转化为 GOS; 采用两相体系或反相胶束可以在一定程度上提高 GOS 产量。应用填充床反应器、活塞流反应器、膜反应器可规模化合成 GOS; 采用色谱柱法、酶法、纳滤膜法和微生物发酵法可纯化 GOS 产品, 去除单糖及乳糖组分, 扩大其应用范围。

关键词: 低聚半乳糖; β -半乳糖苷酶

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0980-06

低聚半乳糖(Galactooligosaccharides, GOS)是一种具有天然属性的功能性低聚糖, 其分子结构一般是在半乳糖或葡萄糖分子上连接 1~7 个半乳糖基, 即 Gal-(Gal) n -Glc/Gal(n 为 0-6)。在自然界中, 动物的乳汁中存在微量的 GOS, 而人母乳中含量较多, 婴儿体内的双歧杆菌菌群的建立很大程度上依赖母乳中的 GOS 成分。目前国际上商品化 GOS 是利用微生物酶法生产, 安全可靠, 并且由于其结构与人类母乳中低聚糖相似, 作为功能食品配料在食品加工业中的应用广泛, 纯度高的 GOS 还可应用于医药。本文综述了微生物酶法合成低聚半乳糖的新进展。

1 低聚半乳糖及其酶法合成原理

低聚半乳糖是众多功能性低聚糖品种中令人瞩目的一种。2001 年 Rycroft 等首次横向比较了低聚果糖、菊粉、低聚木糖、乳酮糖、低聚异麦芽糖、低聚半乳糖和大豆低聚糖等产品在益生作用、短链脂肪酸的生成以及气体产生 3 个方面的发酵特性, 结论是 GOS 在提高双歧杆菌数量、降低梭菌数量、产生乳酸和较少产生气体等各方面均具有突出的优点^[1]。近年

来发现 GOS 除通过增殖双歧杆菌间接产生生理功能之外, 也可以对病原菌的感染直接起到抑制作用。Shoaf 等 2006 年发现 GOS 能阻碍大肠杆菌 E2348/69(O127:H6)致病菌黏附到喉癌 HEp-2 细胞及肠道上皮 Caco-2 细胞上, 并且抗黏附活性显著高于其它低聚糖产品如低聚果糖、菊粉、乳酮糖、棉子糖等^[2]。这一发现对提升 GOS 的药用价值有着重要意义。此外, 还发现 GOS 能阻碍肠道苯酚的产生及其在血清中的积累, 提高肾衰竭病人的生命质量; 降低婴幼儿遗传性过敏症的发生率等^[3,4]。

商品化 GOS 是应用微生物产生的具有转糖基活性的 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, EC 3.2.1.23)以乳糖为原料生产获得^[5-7]。已知有几十种微生物(包含细菌、酵母、霉菌和古细菌)产转糖基 β -半乳糖苷酶, 可用于生产 GOS。在其合成过程中, β -半乳糖苷酶遵循构型保持糖苷酶的作用机制, 其催化位点一对羧基发挥着重要作用, 反应过程中会形成酶-糖基中间物, 当以水为受体时发生水解反应, 以糖类分子如乳糖水解产物、乳糖分子等为受体时发生转糖基反应, 在糖

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA713B04-06); 国家“863 计划”(2006AA10Z338)

*通讯作者。Tel: +86-531-88365128; Fax: +86-531-88565610; E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

作者简介: 卢丽丽(1979-), 女, 湖北襄樊人, 讲师, 主要从事微生物糖苷酶合成糖类的研究。E-mail: graduate531@163.com

收稿日期: 2008-01-13; 修回日期: 2008-03-12

类分子上连接上一个或多个半乳糖基,形成低聚糖产物(图 1),其中二糖产物称为转移二糖(transgalactosylated disaccharides, TD),三糖及三糖以上的组分统称为转移低聚糖(transgalactosylated oligosaccharides, TOS),终产品一般为混合物,包含葡萄糖、半乳糖、未反应的乳糖及低聚半乳糖。例如,日本著名的 GOS 商品 Oligomate 50[®]的生产工艺采用了两种不同微生物来源的天然 β -半乳糖苷酶,根据酶与乳糖的亲合性大小,分两步进行转糖苷作用,其最终商品中 GOS 含量为 50%~52%(包括 TOS 和 TD),乳糖为 10%~13%,单糖为 36%~39%^[7]。

糖类分子多个可以反应的羟基使得半乳糖基与其它糖分子之间的糖苷键型多样,相应地酶法合成的 GOS 糖单元之间可形成 β -D-Gal(1,6)、 β -D-Gal(1,4)、 β -D-Gal(1,3)、 β -D-Gal(1,2)等键型,使得同一种分子量的糖组分往往存在多种同分异构体。不同微生物来源的 β -半乳糖苷酶由于区域选择性及其它催化性质不同,合成的 GOS 结构组分存在差异^[5,6]。表 1 列举了目前报道的几种微生物酶法合成的 GOS 已知结构组分。Oligomate 50[®]主要由来源于米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的 β -半乳糖苷酶以乳糖为底物催化获得,产物为转移二糖到转移六糖,TD 来源于嗜热链球菌,TOS 来源于米曲霉,已知结构主要键型为 β -Gal(1,6)键,有 4 种异构二糖、5 种异构三糖、2 种异构四糖等^[7];由环状芽孢杆菌产生的 GOS 主要产物键型为 β -Gal(1,4)

键,已知结构有 3 种异构二糖、8 种异构三糖^[8]。同一种微生物在不同反应条件下合成的 GOS 在结构上也存在差异。例如,两歧双歧杆菌在酸性条件下(pH4.2~4.5)产物为转移二糖到七糖,主要键型为 β -Gal(1,3)键,已知结构有 3 种异构二糖、3 种异构三糖等^[9],而同一菌种在偏中性条件下(pH6.8)产物为转移二糖到五糖,主要键型为 β -Gal(1,6)键^[10]。

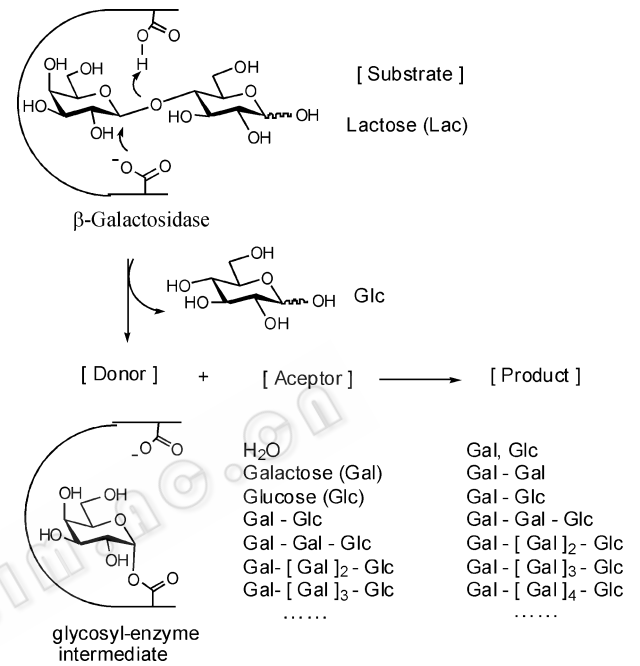


图 1 β -半乳糖苷酶以乳糖为原料合成低聚半乳糖示意图^[7]
Fig. 1 Outline of galactooligosaccharides synthesis by β -galactosidase from lactose^[7].

表 1 微生物酶以乳糖为底物合成的低聚半乳糖已知结构组分
Table 1 Known structures of GOS produced by microbial enzymes from lactose

Microorganism	Known structures of GOS
<i>Streptococcus thermophilus</i> ^[7]	β -D-Gal(1,6)-D-Glc, β -D-Gal(1,6)-D-Gal, β -D-Gal(1,3)-D-Glc, β -D-Gal(1,2)-D-Glc
<i>Aspergillus oryzae</i> ^[7]	β -D-Gal(1,6)- β -D-Gal(1,6)-D-Glc, β -D-Gal(1,4)- β -D-Gal(1,6)-D-Glc, β -D-Gal(1,6)-Lac, β -D-Gal(1,4)-Lac, β -D-Gal(1,3)-Lac; β -D-Gal(1,6)- β -D-Gal(1,6)-D-Lac, β -D-Gal(1,3)- β -D-Gal(1,6)-D-Lac; β -D-Gal(1,6)-[β -D-Gal(1,6)] ₂ -Lac
<i>Bacillus circulans</i> ^[8]	β -D-Gal(1,3)-D-Glc, β -D-Gal(1,6)-D-Glc, β -D-Gal(1,2)-D-Glc; β -D-Gal(1,4)-Lac, β -D-Gal(1,6)- β -D-Gal(1,2)-D-Glc, β -D-Gal(1,4)- β -D-Gal(1,3)-D-Glc, β -D-Gal(1,6)-Lac, β -D-Gal(1,4)- β -D-Gal(1,2)-D-Glc, β -D-Gal(1,2)- β -D-Lac, β -D-Gal(1,4)- β -D-Gal(1,6)-D-Glc, β -D-Gal(1,6)- β -D-Gal(1,3)-D-Glc
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (pH4.2~4.5) ^[9]	β -D-Gal(1,3)-D-Glc, β -D-Gal(1,6)-D-Glc, β -D-Gal(1,6)-D-Gal; β -D-Gal(1,3)-Lac, β -D-Gal(1,6)-D-Lac, β -D-Gal(1,2)- β -D-Gal(1,6)-D-Glc; β -D-Gal(1,3)- β -D-Gal(1,3)-D-Lac; β -D-Gal(1,3)-[β -D-Gal(1,3)] ₂ -Lac; β -D-Gal(1,3)-[β -D-Gal(1,3)] ₃ -Lac; β -D-Gal(1,3)-[β -D-Gal(1,3)] ₄ -Lac
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (pH6.8) ^[10]	β -D-Gal(1,6)-D-Gal, β -D-Gal(1,3)-D-Glc, β -D-Gal(1,3)-D-Gal; β -D-Gal(1,6)-D-Lac, β -D-Gal(1,3)-D-ac; β -D-Gal(1,6)- β -D-Gal(1,6)-D-Lac; β -D-Gal(1,6)-[β -D-Gal(1,6)] ₂ -Lac
<i>Lactobacillus reuteri</i> ^[11]	β -D-Gal(1,6)-D-Glc, β -D-Gal(1,6)-D-Gal; β -D-Gal(1,6)-D-Lac, β -D-Gal(1,3)-D-Lac

2 低聚半乳糖的酶法合成新进展

2.1 微生物酶源

不同微生物来源的 β -半乳糖苷酶的水解活性和转糖基活性相对比例不同,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)等产生的 β -半乳糖苷酶具有较强的水解活性,而环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)等产生的 β -半乳糖苷酶具有较强的转糖基活性,因而在寻找新酶品种方面,有关不同微生物来源的 β -半乳糖苷酶合成 GOS 的研究近年来时有报道,已知的天然酶合成 GOS 的产量一般为 20%~45%^[10-22]。1990 年 Kim 等采用部分纯化的黑曲霉(*Aspergillus niger*) β -半乳糖苷酶合成低聚半乳糖,但产量不高,不到 20%^[12]。1995 年 Onishi 等将有机溶剂处理后的梗孢酵母(*Sterigmatomyces elviae*)休止细胞应用于 GOS 合成研究,低聚糖产量为 37.8%^[13]。2001 年 Rabiou 等采用 5 种双歧杆菌(*Bifidobacterium*)的细胞粗酶液进行 GOS 合成,产量分别为 26.8%、37.6%、43.1%、43.8%、47.6%^[14]。2003 年 Cho 等从布勒掷孢酵母(*Bullera singularis*) KCTC 7534 中纯化 β -半乳糖苷酶,以乳糖为底物进行转糖基反应,生成的低聚糖产量为 50%^[15]。2003 到 2007 年,本研究室先后报道了曲霉(*Aspergillus* sp.) AF、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)2-37-4-1、成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)B1、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)CGMCC 1401 等可用于生产 GOS,采用细胞粗酶液或冻融全细胞合成的低聚糖产量依次为 24%、25.7%、40.7%、55%^[16-19]。2005 到 2007 年,Tzortzis、Splechna、Nakkharat 和 HSU 等研究人员先后将两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)NCIMB 41171、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、嗜热真菌(*Talaromyces thermophilus*)CBS 236.58、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)BCRC 等应用于 GOS 合成研究,采用全细胞或纯化酶进行反应,获得的低聚糖产量分别为 35%、38%、20%、32.5%^[11, 20, 22]。2007 年刘文玉等综述了低温 β -半乳糖苷酶的产生菌株及其应用,该类酶一般来源于节杆菌(*Arthrobacter*)和交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas*),可在低温条件下水解乳糖、合成低聚半乳糖,该类酶应用于食品行业尤其是乳品工业,具有中温和高温 β -半乳糖苷酶所不具备的优越性^[23]。

分子改造糖苷酶可获得高转糖基活性的人工酶,大幅度提高糖类产物的产量。Jorgensen 等 2001 年首

次对两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) β -半乳糖苷酶进行分子改造,筛选高效转糖基酶用于合成 GOS。该酶蛋白含有 1752 个氨基酸,具有 N 端的水解功能域与 C 端的半乳糖结合功能域。其 C 端不同长短 DNA 的缺失突变,产生了一种 C 端 580 个氨基酸缺失的酶,使得具有正常的水解活性和转糖基活性的天然酶变成了一个高效转半乳糖基酶(transgalactosylase),在乳糖底物浓度 10%~40%范围内均表现出转半乳糖基作用:水解作用=9:1 的高比率,并且不需要其他特殊的糖苷类物质和任何辅助因子,表现出一个真正的转半乳糖基酶的特性^[24]。

2.2 转糖基反应及其介质

β -半乳糖苷酶催化合成 GOS 的过程遵循糖苷酶的作用机制,反应处于水解与合成的动态平衡状态,转糖基产物也可以作为底物被酶重新水解。利用酶反应的热力学及动力学原理加大底物的浓度、提高反应温度等可以在一定程度上提高产物的产量;采用高浓度有机溶剂或两相反应体系,降低水的浓度和活性可促使反应平衡向糖苷合成的方向进行,进一步提高糖苷产物的产量。1994 年 Shin 等应用“水-环己烷=5%~95%(V/V)”的两相反应体系,采用米曲霉 β -半乳糖苷酶作用于 55%(W/W)乳糖溶液,获得的 GOS 产量比单一的水相体系提高了 7%(从 38%到 45%),利于 GOS 合成的最佳含水量为 2.5%~10%,而溶剂的极性例如油水分配系数(LogP)和偶极矩等对 GOS 产量没有影响^[25]。1998 年归莉琼等比较了不同有机溶剂作为反应介质时对 GOS 合成的影响,结果发现乙酸乙酯或环己烷体系的 GOS 产量较高,并且疏水性的环己烷有机相抑制低聚糖水解的能力更强于亲水性的乙酸乙酯^[26]。2001 年 Chen 等首次采用反相胶束反应器进行非水介质中的 β -半乳糖苷酶催化反应,在辛丁酯磺酸钠/异辛烷反相胶束体系中,应用米曲霉 β -半乳糖苷酶以 45%(W/V)乳糖底物合成 GOS 的产量为 51.2%,远远高于水相体系产量(31%)^[27]。反相胶束是表面活性剂与含少量水的有机溶剂所组成的体系,该体系中表面活性剂分子的疏水性尾部与有机溶剂接触,亲水性头部聚集水分子形成极性内核,组成一个反相胶束,这样酶分子被限制在含水的内核微环境中,而底物和产物可以自由进出胶束。该反应体系水活度大大降低,不仅能有效抑制乳糖的水解反应,而且能局部浓缩乳糖底物,从而利于合成反应的进行。

2.3 生产工艺

应用固定化酶或采用膜反应器可连续合成 GOS^[28-34], 适合低聚糖规模化生产。1998 年 Shin 等将 *B. singularis* ATCC 24193 β -半乳糖苷酶固定在壳聚糖颗粒上, 应用填充床反应器连续生产 GOS (图 2-A), 以 100 g/L 的乳糖溶液合成的 GOS 产量为 55%^[28]。1999 年王筱兰等应用米曲霉 β -半乳糖苷酶采用同样的方式以 400 g/L 的乳糖溶液生产 GOS, 产量达 62%^[29]。2002 年 Albayrak 等利用活塞流反应器连续催化合成 GOS, 其原理与填充床反应器相同, 不同之处在于以棉布为固定化介质来催化反应^[30]。Foda 等 2000 年设计了两种膜反应器进行 GOS 合成, 分别采用平面超滤膜 (UF member, 10 kDa) 和中空纤维超

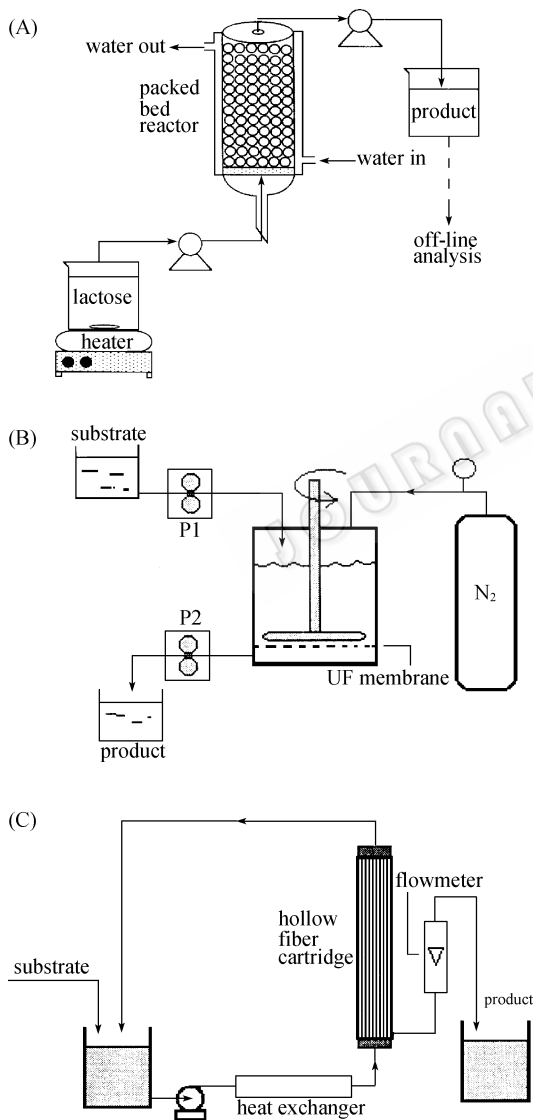


图 2 低聚半乳糖合成用反应器

Fig. 2 Reactors for GOS synthesis. A: Packed bed reactor; B: UF-flat membrane reactor; C: UF-hollow fiber membrane reactor.

滤膜 (UF-hollow fiber membrane, 10 kDa), 前者(图 2-B)适用于实验室规模, 酶反应与膜分离合为一体, 乳糖溶液与酶先短时间恒温水浴反应, 然后打开蠕动泵 P1, P2, 通过控制两个蠕动泵的压力($P1 < P2 =$ 和充入氮气的量控制反应时间, 滤膜截留酶蛋白允许糖分子通过, 采用该反应器将乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) β -半乳糖苷酶以乳清(23%乳糖)为底物进行反应, GOS 最大产量(约 20%)能持续 2.45 小时; 后者(图 2-C)适用于中试规模, 酶反应与膜分离由两个单元组成, 乳糖溶液与酶短时间恒温水浴反应, 再打开蠕动泵, 酶与反应物流向纤维滤筒, 产物滤过纤维滤膜, 而酶分子被截留后再返回容器内继续反应, 采用相同酶源以乳清(20%乳糖)为底物, GOS 最大产量能达到 31%^[31]。Chockchaisawasdee 等 2005 年利用纤维滤膜(10 kDa)反应器, 采用相同酶源以 250 g/L 乳糖溶液为底物获得的 GOS 产量为 10.2%^[32]。Splechna 等 2007 年利用聚醚砜超滤膜 (10 kDa) 反应器和罗伊氏乳杆菌 β -半乳糖苷酶连续生产 GOS, 当乳糖浓度为 600mM 时, 能连续 6 天保持 GOS 产量为 24%^[33]。膜反应器工艺较为简单, 但目前所获得的 GOS 产量一般较低(10%~30%)。

2.4 纯化工艺

微生物酶法获得的低聚半乳糖产品中含有葡萄糖和乳糖, 这两种组分不利于糖尿病患者及乳糖不耐症患者使用, 去除该类组分能扩大 GOS 应用范围。目前 GOS 的分离纯化技术主要有色谱柱法、酶法、纳滤膜法和微生物发酵法。工业上利用活性炭作为色谱柱填料, 采用乙醇溶液梯度洗脱去除单糖, 但乳糖很难与低聚半乳糖分离; 硅胶和离子交换树脂通常也可以作为色谱柱填料用于低聚半乳糖产品的分离, 但由于分离效率低, 操作复杂, 导致分离后的成本大幅增加而限制其应用。酶法是利用酶制剂将 GOS 产品中的葡萄糖或乳糖专一性地去除, 例如, 葡萄糖氧化酶和纤维二糖脱氢酶能分别将葡萄糖和乳糖氧化为葡萄糖酸、乳糖酸, 再通过离子交换树脂去除^[35], 但该法中的酶制剂价格昂贵, 限制了其工业化应用。利用纳滤膜分离法纯化低聚半乳糖产品, 选择不同孔径的纳滤膜, 可将单糖、乳糖、低聚半乳糖依次分开, 但设备昂贵, 成本高, 难以工业化应用。微生物发酵法是利用某些酵母细胞优先代谢葡萄糖、半乳糖或乳糖的特异性将该类糖组分发酵去除, 工艺简单、设备投入成本较低。2006 年 Cheng 等采用马克斯克鲁维

酵母(*Kluyveromyces marxianus*) ATCC 56497 游离细胞处理一株芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶合成的低聚半乳糖产品,结果乳糖被完全去除,单糖含量小于3%,GOS含量由原来的38%提高到97.5%^[36]。但该方法中采用的游离细胞寿命较短且不易收集,难以重复使用。2007年本实验室首次应用固定化酿酒酵母细胞批次处理保加利亚乳杆菌 β -半乳糖苷酶生产的低聚半乳糖产品(45%),能连续反应20批次保持糖溶液中的葡萄糖被完全去除、半乳糖含量小于1%、低聚半乳糖含量大于71.5%(数据未发表)。

3 展望

国际上功能性低聚糖的研究和应用发展迅速,功能性低聚糖作为功能性食品的基料已广泛应用于各种保健食品、婴幼儿食品。此外,在医药和饲料行业上的应用也较多,其品种和产量都在迅速增加。日本和欧美国家是国际上较早开发应用功能性低聚糖的国家,处于世界领先地位。2000年日本功能性低聚糖产品中,低聚半乳糖的年销售额居首位。欧洲目前市场上主要功能性低聚糖商品为低聚半乳糖和低聚果糖。随着低聚半乳糖新功能的进一步开发,其市场范围将会扩大,生产竞争将会增强,优良生产菌种的开发、生产工艺的优化等仍是继续研究的内容,以降低成本。另外,由于纯度高的低聚半乳糖具有重要的药用价值,低聚半乳糖产品的纯化工艺也值得深入研究。

我国对功能性低聚糖的开发虽然远远落后于日本和欧美国家,但发展迅速,已有某些功能性低聚糖实现了工业化生产,但目前自主的微生物酶法生产低聚半乳糖工业尚属空白。2004到2005年本实验室采用自主知识产权的微生物酶源成功进行了50公斤级低聚半乳糖中试生产,相信国内自主的GOS工业化生产将很快被实现。

参 考 文 献

- [1] Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, et al. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol*, 2001, 91(5): 878–887.
- [2] Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, et al. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infect Immun*, 2006, 74(12): 6920–6928.
- [3] Kawakami K, Makino I, Asahara T, et al. Dietary galacto-oligosaccharides mixture can suppress serum phenol and p-cresol levels in rats fed tyrosine diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005, 51(3): 182–186.
- [4] Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, et al. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(1): 192–198.
- [5] Mahoney RR. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chem*, 1998, 63(2): 147–154.
- [6] Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int Dairy J*, 1999, 9(1): 69–80.
- [7] Nakakuki T. Oligosaccharides, production, properties, and applications. Switzerland: Gordon and Breach Science Publisher, 1993, pp90–106.
- [8] Yanahira S, Kobayashi T, Suguri T, et al. Formation of oligosaccharides from lactose by *Bacillus circulans* beta-galactosidase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(6): 1021–1026.
- [9] Vincent D, Jean M and Stéphane B. Primary structure of ten galactosides formed by transglycosylation during lactose hydrolysis by *Bifidobacterium bifidum*. *Carbohydr Res*, 1990, 201(1): 115–123.
- [10] Tzortzis G, Goulas AK, Gee JM, et al. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *J Nutr*, 2005, 135(7): 1726–1731.
- [11] Splechtna B, Nguyen TH, Steinbock M, et al. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(14): 4999–5006.
- [12] Kim CR, Lee SR, Lee YK. Formation of galactooligosaccharides by the partial purified beta-galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1. *Han'guk Ch'uksan Hakhoehchi*, 1990, 32: 323–333.
- [13] Onishi N, Yamashiro A, Yokozeki K. Production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(11): 4022–4025.
- [14] Rabi BA, Jay AJ, Gibson GR, et al. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(6): 2526–2530.
- [15] Cho YJ, Shin HJ, Bucke C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing beta-galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(24): 2107–2111.
- [16] 袁绍鹏, 肖敏, 孙正, 等. 一株曲霉(*Aspergillus* sp. AF) β -半乳糖苷酶的转糖基活性的研究. 食品与发酵工业(*Food and Fermentation Industries*), 2003, 29(11): 31–34.
- [17] 王红妹, 肖敏, 李正义, 等. 转糖基 β -半乳糖苷酶产生菌筛选和鉴定及酶催化生成低聚半乳糖. 山东大学学报(*Journal of Shandong University*), 2006, 41(1): 133–139.
- [18] 卢丽丽, 肖敏, 徐晓东. 转糖基 β -半乳糖苷酶产生菌 *Enterobacter agglomerans* B1: 筛选鉴定、发酵产酶及其合成低聚半乳糖的研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(1): 38–44.
- [19] 肖敏, 卢丽丽. 一种转糖基 β -半乳糖苷酶产生菌. 专利号: ZL 2005 1 0044097.7.
- [20] Tzortzis G, Goulas AK, Gibson GR. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifido-*

- bacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(3): 412–416.
- [21] Nakkharat P, Haltrich D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with beta-glucosidase and beta-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *J Biotechnol*, 2006, 123(3): 304–313.
- [22] Hsu CA, Lee SL, Chou CC. Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(6): 2225–2230.
- [23] 刘文玉, 史应武, 王杏芹, 等. 低温 β -半乳糖苷酶的研究进展. 新疆农业科学(*Xinjiang Agricultural Sciences*), 2007, 44(5): 647–651.
- [24] Jorgensen F, Hansen OC, Stougaard P. High-efficiency synthesis of oligosaccharides with a truncated beta-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(5-6): 647–652.
- [25] Shin HJ, Yang JW. Galacto-oligosaccharide production by β -galactosidase in hydrophobic organic media. *Biotech Lett*, 1994, 16(11): 1157–1162.
- [26] 归莉琼, 魏东芝, 崔玉敏, 等. 米曲霉 β -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖. 华东理工大学学报(*Journal of East China University of Science and Technology*), 1998, 24(4): 422–426.
- [27] Chen SX, Wei DZ, Hu ZH. Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by beta-galactosidase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2001, 16(2): 109–114.
- [28] Shin HJ, Park JM, Yang JW. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochem*, 1998, 33(8): 787–792.
- [29] 王筱兰, 魏东芝, 崔玉敏, 等. 固定化酶催化合成低聚半乳糖. 华东理工大学学报(*Journal of East China University of Science and Technology*), 1999, 25(2): 144–146.
- [30] Albayrak N, Yang ST. Production of Galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77(1): 8–19.
- [31] Foda M I, Lopez-Leiva M. Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. *Process Biochem*, 2000, 35(6): 581–587.
- [32] Chockchaisawasdee S, Athanasopoulos V I, Niranjana K, et al. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(4): 432–443.
- [33] Splechtina B, Nguyen T H, Haltrich D. Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(16): 6772–6777.
- [34] 陈少欣, 魏东芝, 胡振华, 等. 固定化嗜热脂肪芽孢杆菌合成低聚半乳糖. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2001, 41(3): 357–362.
- [35] Splechtina 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. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 29(6-7): 434–440.
- [36] Cheng CC, Yu MC, Cheng TC, et al. Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(11): 793–797.

Recent progress on galacto-oligosaccharides synthesis by microbial β -galactosidase—A review

Lili Lu, Zhengyi Li, Min Xiao*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Galacto-oligosaccharides are among the most promising non-digestible oligosaccharides that are recognized as prebiotics. Commercial GOS are synthesized from lactose using the transglycosylation activity of β -galactosidase from microorganisms. The structure of GOS varies with different enzyme source. The oligosaccharide yields of GOS produced by natural enzymes are generally 20%–45% and they could be improved by artificial enzyme. Reaction conditions also have effect on the oligosaccharide yield. Using enzymes in water-hydrophobic solvent mixtures or reverse micelles may improve the yield to some extent. GOS can be large-scale synthesized by packed bed reactor, plugflow reactor or membrane reactor. The glucose and lactose in the GOS products can be removed by using chromatography, enzyme oxidation, nanofiltration membrane or microbial fermentation.

Keywords: galacto-oligosaccharides; β -galactosidase

Supported by the 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2004BA713B04-06) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10Z338)

*Corresponding author. Tel: +86-531-88365128; Fax: +86-531-88565610; E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

Received: 13 January 2008/ Revised: 12 March 2008