

基于 β -半乳糖苷酶的低聚半乳糖制备研究进展

吴昊¹, 齐崴^{1,2,3*}, 尤生萍^{1,3}, 苏荣欣^{1,2,3}, 何志敏^{1,2}

¹ 天津大学化工学院 天津 300072

² 化学工程联合国家重点实验室(天津大学) 天津 300072

³ 天津市膜科学与海水淡化技术重点实验室 天津 300072)

摘要 低聚半乳糖(GOS)是一种广泛存在于人类母乳中的天然功能性食品成分,通过 β -半乳糖苷酶(β -gal)酶法生产是目前商业上最重要的 GOS 来源。 β -gal 是一类重要的糖苷水解酶,具有水解和转糖苷功能。由于 β -gal 来源和应用方式的复杂性,对应的 GOS 产物在结构和纯度上有很大差异,因此,以高产高纯度 GOS 为导向的 β -gal 研究一直受到广泛关注。本综述从机理分析,酶种来源,催化方式角度出发,比较不同来源和应用方式的 β -gal 在催化 GOS 合成过程的表现,在此基础上展望 β -gal 在 GOS 生产中的应用发展方向。

关键词 低聚半乳糖; β -半乳糖苷酶; 转糖苷反应; 固定化; 透性化

文章编号 1009-7848(2022)03-0329-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.036

随着人口老龄化进程的逐步加快,亚健康问题愈发严重,我国于 2016 年制定实施的《“健康中国 2030”规划纲要》中明确提出要引导合理膳食,提高妇幼健康水平。低聚半乳糖(Galacto-oligosaccharides, GOS)是一种以碳水化合物为基础的益生元成分,与人乳中起到益生元作用的人乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)在结构和功能上具备一定的相似性,可以被人体内的乳酸菌、双歧杆菌等肠道微生物特异性消化^[1]。如图 1 所示, GOS 结构在糖单体组成、聚合程度和糖苷键的区域化学性质方面存在差异,这使得不同的 GOS 产物具有不同的益生效应^[2]。以往的研究发现, GOS 在促进肠道有益细菌增殖,预防病原体黏附,刺激肠道屏障功能,预防感染和提高免疫力方面表现出与 HMOs 相仿的作用^[3],因此在“类母乳”婴儿配方产品的开发方面颇有价值^[4]。除此之外,近年来对 GOS 益生作用的进一步研究表明, GOS 与褐藻寡糖联用能有效调节肠道菌群和胆汁酸代谢,以改善高脂饮食诱导的血脂异常^[5]。同时,可有效改善肥胖成年人的肠道屏障功能^[6],因此对 GOS 的研究在功能性食品开发领域具有重要的意义。

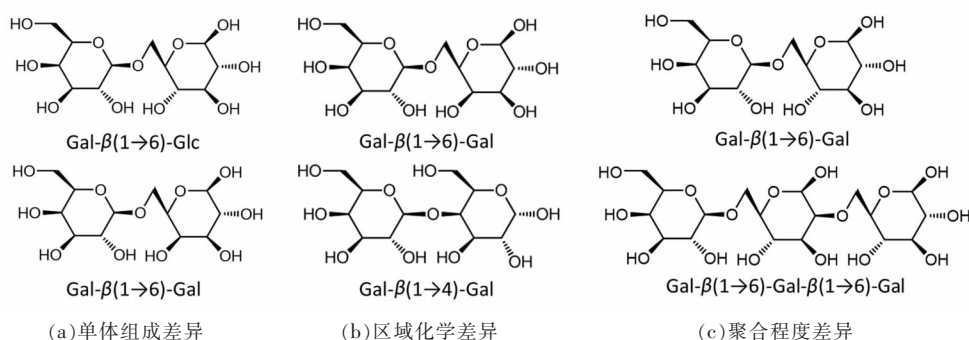
自然界中 GOS 通常在豆类、海藻和其它部分食物中被检测到,含量极为稀少^[7],天然牛乳仅含有极少量的低聚糖(0.05 g/L)^[8],而 GOS 本身无色且不带电荷,分离困难,因此通过天然物质提取 GOS 缺乏可行性。化学法合成的低聚糖类混合物中具有多种 α -或 β -键结构,缺乏特异性,难以满足市场要求^[9],而且化学合成法普遍存在过程繁琐,产率低,污染高等问题^[10],罕有实际应用。目前对 GOS 合成的研究,主要是以酶法合成为主,糖基转移酶对糖和糖苷配体有高度的特异性,是 GOS 合成过程的高效催化剂,因价格高昂,故工业应用困难^[11]。 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)(EC3.2.1.23)广泛存在于微生物、植物、动物等细胞中,能够针对性地催化乳糖中末端非还原性 β -D-半乳糖苷单元和糖苷配基部分之间的糖苷键水解,同时通过动力学控制的乳糖半乳糖基化反应来催化 GOS 化合物的合成。目前工业上生产 GOS 的主要方法就是利用 β -gal 催化乳糖或乳清以合成 GOS。这种方法反应条件温和,操作简单,效率高,被认为有效且适用于规模化生产^[12-13]。本文从机理、酶源、应用方式角度讨论 β -gal 在 GOS 生产工艺中的应用,不同来源 β -gal 催化合成 GOS 的效果,并评价 β -gal 不同催化形式的优、缺点。介绍一套基于全细胞法生产高纯度 GOS 的工艺。

收稿日期: 2021-03-15

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2019M651040)

作者简介: 吴昊(1996—),男,硕士

通信作者: 齐崴 E-mail: qiwei@tju.edu.cn



注:Gal:半乳糖;Glc:葡萄糖。

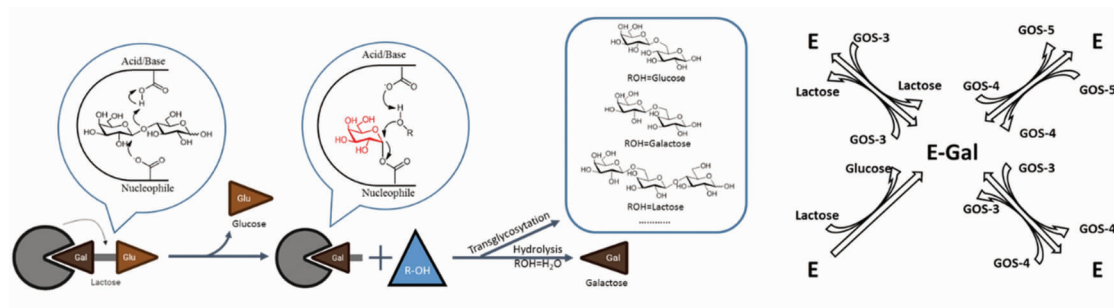
图1 GOS结构的复杂性^[2]

Fig.1 Examples of how GOS structure can vary^[2]

1 反应机理简述

β -gal 同时具备水解活性与转糖苷活性,以乳糖为底物,可催化生成 GOS、葡萄糖与半乳糖。关于 β -gal 催化反应发生的机制,目前普遍认可 Koshland 等^[14]基于不同产物的立体化学构型分析,从而提出的保留型水解机制,认为底物通过双重位移机制,分两步完成反应。第一步是糖苷配基的释放和半乳糖基-酶复合物的形成, β -gal 具备高度专一性,在反应中特异性攻击底物的 β -半乳糖苷键,在实际反应中底物分子可以是乳糖或低聚糖。如图 2a 所示,乳糖作为底物时,释放一分子葡萄糖,同时半乳糖基与 β -gal 相结合形成共价半乳糖基-酶中间体,过程涉及到两个谷氨酸残基

的参与,第 1 个催化残基作为亲核基团,攻击 β -半乳糖苷键的异头中心,生成半乳糖基酶复合物,而第 2 个残基充当酸,将质子传递到糖苷键中的氧原子上,以活化的糖苷配基作为离去基团;第二步反应中在第 2 个催化残基的辅助下,含有羟基的亲核试剂脱去羟基中的质子,充当半乳糖残基的受体,使产物从酶的活性位点中释放出来,以产生保留底物的单体构型产物^[15-16]。在这一步反应中,当半乳糖基受体为水分子时,反应释放出半乳糖和葡萄糖,即为水解反应。而当受体为另一个多糖时,则生成了低聚半乳糖,即为转糖苷反应^[2],而且由于底物的多样性,在乳糖催化反应体系中将存在大量单糖, GOS 二糖, 三糖及以上产物(如图 2b)^[17]。



注:E:酶;E-Gal*:酶-半乳糖基复合体。

图2 β -gal 催化反应机制

Fig.2 β -Galactosidase catalytic reaction mechanism

2 酶源筛选

酶种来源是 GOS 合成的重要因素,不同来源

的 β -gal,酶学性质差异大,动力学行为^[18]也存在区别。在 GOS 合成研究中最重要操作变量如温

度、pH 值、酶负荷和底物浓度等均取决于酶种来源,甚至在研究中发现对于不同的酶,半乳糖和葡萄糖等竞争性抑制剂的影响也存在差异^[19]。如表 1^[13,20-24]所示,由于不同来源的 β -gal 对水和糖类的选择特异性存在差别,根本上决定了 GOS 合成反应的产物组成和产率。因此在酶法制备 GOS 工艺的开发过程中,酶来源的筛选鉴定是研究的重要环节。

2.1 常规来源

来自米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)的 β -gal 通常是乳品工业商业酶制剂的首选^[25]。表 2^[13,26-40]综合了不同来源 β -gal 的催化表现。来自乳酸克鲁维酵母 β -gal 的最佳 pH 值接近 6.5,催化温度在 35~40 °C,GOS 产率约为 30.0%,且含有大量益生作用不明的二糖^[13,28,38,41]。而环状芽孢杆菌来源的 β -gal,催化温度通常在 40~60 °C,pH 值接近 6.0,GOS 最大产率约为 40.0%^[26,31-32,42-43],该酶在实际工业发酵过程中表现较好,一直是工业生产的首选。来自米曲霉的 β -gal 具有最高的热稳定性和反式半乳糖基化活性,而且价格便宜,但是在合成过程中 GOS 产率普遍低于 30.0%^[28,30,33,37,38,44]。Vera 等^[17,45]基于米曲霉来源的 β -gal,分批合成 GOS,终产率维持在 28.0 g GOS/100 g 乳糖左右。同样的,Cinar 等^[30]通过试验与动力学参数模拟结合优化试验条件,米曲霉来源的 β -gal 的产率也止步 26.73%。Fischer 等^[46]研究了乳酸克鲁维酵母和米曲霉来源的两种 β -gal 在 GOS 合成反应中的联用效果,结果表明在米曲霉 β -gal 与乳酸克鲁维酵母 β -gal 顺序联用的情况下,总 GOS 的产率从 24.6%提高到 33.1%。

如表 1 所示,不同来源的 β -gal 合成的 GOS 结构也呈现出较大的差异。Rodriguez-colinas 等^[13]发现由乳酸克鲁维酵母来源的 β -gal 催化 GOS 生产中,主要产物是在两个半乳糖或半乳糖和葡萄糖之间以 β -(1→6)键连接的二糖。而在对环状芽孢杆菌来源的 β -gal 合成产物研究中,通过凝胶渗透色谱法,碳色谱法和 HPLC 法发现并鉴定了 11 种低聚糖,产物结构表现出了高度的复杂性,主要的反式半乳糖基化产物是三糖 Gal- β (1→4)

-Gal- β (1→4)-Glc 和四糖 Gal- β (1→4)-Gal- β (1→4)-Gal-Glc^[22,32]。米曲霉来源的 β -gal 催化反应中,主要产物为三糖,其结构为 Gal- β (1→6)-Gal- β (1→4)-Glu^[46]。Ferreira-lazarte 等^[47]用猪的小肠刷状边界膜囊泡检测了糖苷键和单体组成影响对肠消化酶的抗性,结果表明 GOS 混合物中 β (1→3)最容易水解(50.2%),其次是 β (1→4) (34.9%),而 β (1→6)键表现出了最强的消化抗性(27.1%),对肠道菌群的特异性吸收更为有利。同时低聚半乳糖的化学结构一定程度上影响着肠道内益生菌的发酵模式,其中 β (1→6)键能较快的被双歧杆菌中的 β -gal 切割,从而表现出较好的双歧效应^[48]。因此乳酸克鲁维来源的 β -gal 在生产中产物组成方面存在一定优势。另一方面,在以不同组成 GOS 为目的产品时,环状芽孢杆菌是富集三糖的产品的最佳选择。若目标产物以二糖和三糖为主,乳酸克鲁维酵母和米曲霉来源的 β -gal 将是更好的选择^[20]。Fischer 等^[49]对葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶与 β -gal 的联用中发现,虽然 GOS 相对产率有所下降,但是相应的 GOS 三糖以上的糖的合成均得到增强。此外在米曲霉 β -gal 与乳酸克鲁维酵母 β -糖苷酶联用的研究过程中,除了 GOS 产率的提升外,产物结构上的比例也有所变化,比如三糖的含量从 16.6%上升至 18.3%^[46]。这一系列的研究表明,由于对不同底物的选择性差异,多来源酶的复合使用在提高 GOS 终产率,调整 GOS 产物结构比例方面的研究颇为令人期待,这也为酶学性质研究较深入的常规酶源的进一步开发利用提供了一条新思路。

2.2 特殊益生菌来源

从细菌中提取的 β -gal 由于其高活性,易发酵和较高的稳定性被广泛应用于乳糖的水解。其中,乳酸菌(包括 *Lactococci*,*Streptococci* 和 *Lactobacilli*)及双歧杆菌(*Bifidobacterium*)被认定为“一般认为安全(generally recognized as safe, GRAS)”的微生物,而且作为益生菌普遍存在于我国公布的可用于食品、婴儿食品和保健食品的菌种名单中,本身广泛存在于人体的肠道内,起到帮助消化,调节机体胃肠道菌群的作用,自身具备显著的健康效益,以其为来源的食品级 β -gal,在功能性食品领域备受关注。

Kittibunchakul 等^[36]从乳酸杆菌 DSM20075 中提取的 LacLM 型 β -gal 在大肠杆菌 (*E. coli* BL21Lh β -gal) 和植物乳杆菌 (Lp609Lh β -gal) 中进行异源表达, 两种宿主细胞所表达的 β -gal 在相同催化条件下, GOS 产率分别达到了 33.0% 和 26.0%。Fureder 等^[24]在评价了来源于双歧杆菌的新型商业 β -gal 的转糖基活性, 在 40 °C 和 pH 值约 6.0 下, 乳糖浓度增加至 400 g/L 能够达成 GOS 的大量生成 (107.2 g/L, 产率: 27%), 而且在过程中先后形成大量 $\beta(1\rightarrow3)$ 和 $\beta(1\rightarrow6)$ 键, 几乎没有 $\beta(1\rightarrow4)$ 的存在。事实上, 来自乳酸菌和双歧杆菌的 β -gal 合成的 GOS 含有更多的 $\beta(1\rightarrow6)$ 和 $\beta(1\rightarrow3)$ 键, 相比含有 $\beta(1\rightarrow4)$ 和 $\beta(1\rightarrow6)$ 键的 GOS 混合物表现出了更好的双歧效应, 理论上具有更佳的益生效益。同时如表 2 所示, 部分益生菌来源的 β -gal 在最佳反应条件下, GOS 产率最高可达 43.0%^[29]。该种益生菌来源的 β -gal 在营养价值与生产能力方面均表现出较好的潜力, 是 GOS 生产研究中的重要方向。

2.3 耐热微生物来源

耐热 β -gal 主要来源于一些高温菌和中温细菌, 如耐热嫌气菌、栖热菌、嗜热菌和古细菌等^[50]。从技术角度来看, 来自嗜热微生物的 β -gal 非常适用于 GOS 生产规模化工艺的开发, 乳糖底物在常温下的溶解度相对较低, 温度直接影响到反应底物乳糖的饱和浓度, 降低了水分子作为受体的几率, 而且在高温情况下酶的初始反应速率较高, 表现出较强的转糖基活性, 从而显著促使 GOS 产率的升高, 还能有效防止微生物污染^[40, 51-53]。由于大多数耐热 β -gal 均来自于嗜热微生物, 因此发酵产酶效率很低。因此有关耐热 β -gal 的工业化研究多是通过在中温宿主的异源表达来完成, 比如 Kong 等^[54]将源于嗜热单胞菌 *Thermotoga* *naphthophila* RUK-10 的 β -gal 构建在大肠杆菌 BL21 中, 经表达和纯化后的酶在 70 °C 下表现出稳定的乳糖水解活性, 且在 70~85 °C 下稳定性良好, 在合成烷基半乳糖苷中也表现出良好的反式糖基化活性, 具备良好的生物技术应用潜力。

除此之外, 在 β -gal 的开发应用方面, 对新来源 β -gal 的表达鉴定工作一直是持续性的工作, Xin 等^[55]近期从婴儿粪便中提取了一种新型 β -

gal, 在大肠杆菌中表达后表现出了高水解和反半乳糖基化活性, 在 20% 初始乳糖浓度 50 °C 的条件下获得了 33.4% 的 GOS 收率, 远高于工业上常用的米曲霉。Li 等^[56]在海洋细菌交替单胞菌 *Alteromonas* sp. QD 01 中克隆了一个新的 β -gal 基因 *gal2A* 并在大肠杆菌中表达, 在 6.0~9.5 的 pH 值范围内显示出广泛的 pH 值稳定性, 且具备高转糖基活性, 对牛奶中的乳糖水解和 GOS 的生产可能是潜在的优质催化剂。在新来源的开发过程中, 新来源的 β -gal 由于其不同的最适条件和催化能力, 可能是 GOS 生产工艺发展的潜在推动力。

3 应用形式

3.1 游离酶

由于 β -gal 在大多数菌株内通常以胞内酶的形式存在, 通常需要经过破碎提纯, 才能作为游离酶参与反应。而且游离酶应用于催化反应中, 稳定性较差, 容易变性失活, 且随着反应时间推移, 活性流失快, 汤卫华等^[57]的研究中, 游离 β -gal 在 1 周内, 酶活力下降了 40%; 游离酶在反应结束后成为杂质且难以剔除, 给产物的分离纯化造成困难, 容易导致蛋白质污染。在有关低聚糖分离的研究中发现, 基于超滤膜对大分子低聚糖与生物酶的优异阻隔效果 (如图 3a), 超滤膜能有效用于酶法水解大分子聚糖所得的小分子低聚糖分离过程^[58], 从而对酶法合成 GOS 研究中低聚半乳糖与 β -gal 的分离有着潜在的应用价值。Ren 等^[59]将超滤膜反应器 (UMR) 与纳滤分离系统 (CPNSS) 相结合, 基于 *K. lactis* 商业游离酶建立连续反应纯化体系, 在 4 h 的连续反应中获得总质量分数为 33.4% 的 GOS 产品, 终纯度为 57.2%。虽然目前的超滤膜反应器的发展仍然受限于膜污染和酶的复用性问题 (如图 3b), 但是一定程度上为游离酶的工业化利用提供了可行方案。

3.2 固定化酶

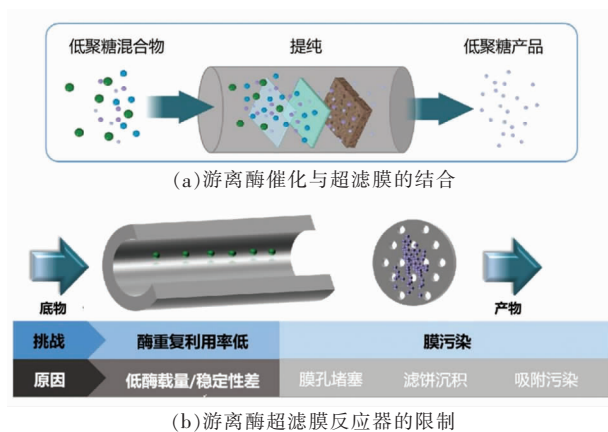
3.2.1 载体固定化 为改善游离酶 β -gal 稳定性, 提高工业应用价值, 对于 β -gal 固定化应用的研究愈发深入。如图 4a 所示, 酶固定化可以通过物理或化学方法如吸附^[61]、诱导和包埋^[62], 将酶限制在载体内, 或与载体通过弱相互作用连接, 比如

表 1 不同来源 β -gal GOS 产物主要结构组成^[13,20-24]
 Table 1 Main structural components GOS from different sources of β -galactosidase^[13,20-24]

菌株来源	主要产物结构组成			参考文献
	二糖	三糖	四糖及以上	
乳酸克鲁维酵母	β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Gal	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc	β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc	[13]
	β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc			
嗜酸乳杆菌	β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-Glc	β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc β -D-Gal(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 2)-D-Glc β -D-Gal(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-Glc β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 2)-D-Glc β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 2)-D-Glc β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc β -D-Gal(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-Glc	-	[22]
	β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-Glc			
	β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc			
	β -D-Gal-(1 \rightarrow 2)-D-Glc			
双歧杆菌	Gal- β (1 \rightarrow 6)-Glc	Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc	Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc	[24]
	Gal- β (1 \rightarrow 3)-Glc			
	Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal			
米曲霉	Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal	Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal Gal- β (1 \rightarrow 3)-Glc	Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc	[20]
	Gal- β (1 \rightarrow 6)-Glc			
	Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal			
	Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal			
	Gal- β (1 \rightarrow 3)-Glc			
高温乳酸链球菌	β -D-Gal(1,6)-D-Glc	-	-	[23]
	β -D-Gal(1,6)-D-Gal			
	β -D-Gal(1,3)-D-Glc			
	β -D-Gal(1,2)-D-Glc			

表2 最佳反应条件及GOS收率^[13, 26-40]Table 2 Optimal reaction conditions and GOS yield^[13, 26-40]

菌株来源	应用形式	反应温度/°C	pH 值	GOS 产率/%	初始乳糖组成	参考文献
米曲霉菌	游离酶	55	4.5	24.3	200 g/L	[38]
	游离酶	40	4.5	21.0	41.2%	[28]
	游离酶	40	4.5	23.0	400 g/L	[33]
	游离酶	47.5	4.5	29.0	50%	[37]
	游离酶	36.8	4.5	26.73	32°Brix	[30]
	固定化酶	40	4.5	31.0	400 g/L	[33]
乳酸克鲁维酵母	游离酶	45	6.5	32.0	200 g/L	[38]
	游离酶	40	7.5	11.0	41.1%	[28]
	全细胞	40	6.8	44.0	400 g/L	[13]
环状芽孢杆菌	游离酶	40	7	41.0	39.0%	[28]
	游离酶	40	6.6	45.0	100 g/L	[31]
	游离酶	40	5.5	49.4	400 g/L	[32]
	固定化酶	58	6	64.0	55%	[26]
瑞士乳杆菌	游离酶	37	6.5		205 g/L	[36]
嗜酸乳杆菌	游离酶	30	6.5	38.5	205 g/L	[27]
乳杆菌	游离酶	17	6	28.0	205 g/L	[34]
罗伊氏乳杆菌	游离酶	30	6.5	38.0	205 g/L	[35]
双歧杆菌	全细胞	39	6.8	35.0	550 g/L	[39]
	全细胞	40	6.8	36~43	450~500 g/L	[29]
嗜热栖热菌	游离酶	70	7	35.3	40%	[40]

图3 游离酶催化的发展方向与限制^[50]Fig.3 Development direction and limitation of free enzyme catalysis^[60]

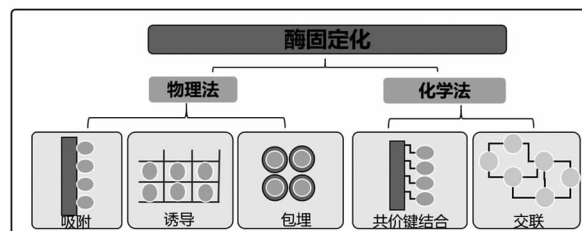
通过酶与载体之间的共价键来实现^[63]。在酶法生产GOS工艺的研究中,固定化酶的催化性能与固定化的方法和载体材料密切相关。Gonzalez-Delgado等^[64]的研究表明,具有不同结构和孔径分布的载体对 β -gal酶活的影响差异明显,来自棘孢

曲霉的 β -gal在游离状态下产率为11.2%(28 g/L),固定在最优载体ULP-SBA-15对应的产率可达20.2%(50.5 g/L)。但是也存在部分材料如SBA-15对产率有一定抑制,终产率为1.3%(3.2 g/L)远低于游离状态下的酶。理想的固定化载体材料要求机械强度高、稳定性好,传统的无机和高分子材料,比如二氧化硅,氧化铝等,由于活性损失大,稳定性差,逐渐被新型固定化材料取代,比如磁性载体材料。改性后的磁性载体材料是一种良好的生物酶载体材料,磁性材料固定化酶可通过外加磁场快速回收和调控位置,增强搅拌效果。Chen等^[65]通过交联剂三羟甲基磷(THP)与载体连接方式将 β -gal固定在壳聚糖包被的磁性 Fe_3O_4 纳米粒子上,在36%的初始乳糖浓度下获得GOS产品的产率为50.5%,而且表现出较强的稳定性,在45°C下孵育14 d后的残留活性分别为62.0%,相比游离酶显著提高了酶的稳定性,并且该种磁性材料在吸脱附5次后仍能保持初始酶活的92.0%,表现

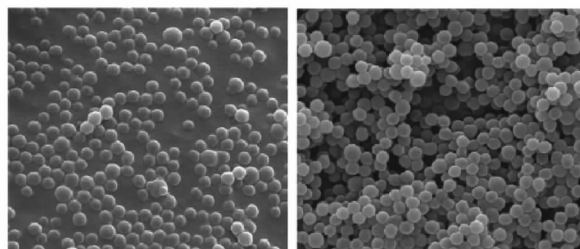
出了良好的循环性能。

为了进一步改善固定化酶的特性，通常将多种技术组合应用于固定化材料中，Liu 等^[66]在 β -gal 磁性聚合纳米球载体制备的基础上，通过缩合反应将聚乙烯亚胺 (PEI) 共价连接到磁性聚 (GMA-EDGMA-HEMA) 纳米球表面，从而使得纳米球载体表现出了优异的单分散性能，同时负载在载体上的酶量最高达 86.7 mg/g，与传统的酶固定化载体相比，为酶的吸附提供了更大的比表面积 (如图 4b)，最终生产能力相比游离酶提高约 8 倍。

3.2.2 无载体固定化 无载体固定化脱离了载体限制，制备方法简单，主要包括喷雾干燥、交联酶、交联酶晶体 (CLECs) 和交联酶聚体 (CLEAs)^[68]。CLEAs 由于酶活高、稳定性好，机械结构强，且免去了复杂的酶纯化步骤等潜在优势 (如图 5a)，在 β -gal 酶制剂制备中表现出优异的性能^[69]。CLEAs 的制备通常向酶的水溶液中加入蛋白沉淀剂如硫酸铵，使酶沉淀析出形成非共价键连接的聚集体，保证三维构象不被破坏，然后加入交联剂使醛基与酶上的游离氨基发生 Schiff 碱反应产生交联^[70]。Li 等^[71]基于 β -galBgal1，以戊二醛作为交联剂，制备酶聚体 Bgal1-3-CLEAs，结果表明相比游离酶 (57.1%)，酶聚体获得了更高的 GOS 产率 (59.4%)，并且在 10 个批次的重复后仍保留了 82.0% 的初始活性，且第 10 批 GOS 收率依然能维持在 52.3%，显著提高了热稳定性和储存稳定性。CLEAs 可由两种或两种以上的酶共同固定化以获



(a) 主要的酶固定技术^[67]

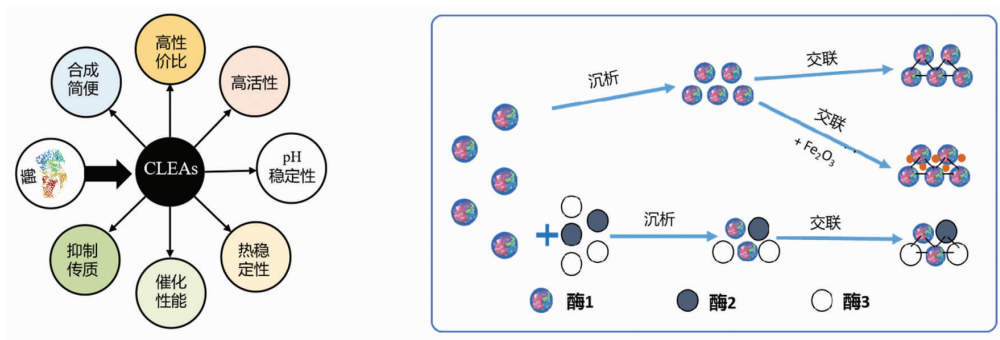


(b) 磁性聚 (HEMA-EGDMA) 纳米球与 PEI 修饰后的扫描电子显微镜图^[66]

图 4 载体固定化的主要技术与发展

Fig.4 Main technology and development of carrier immobilization

得更强的催化能力 (如图 5b)，单独或顺序组成催化级联过程^[68]；另一方面，交联酶聚体也可与介孔材料或纳米材料等结合，开发具备特殊复合性能的产品^[72]。孙槐胜等^[70]通过将牛血清蛋白修饰的磁性纳米颗粒引入到 CLEAs 中 (如图 5b)，制备复合磁性交联酶聚体，解决了传统 CLEAs 由于粒径通常在微米尺寸，离心或过滤操作易聚集，难以回收的问题，进一步扩大了 CLEAs 的应用范围，而且为低成本合成 GOS 提供了可行的催化剂。



(a) 交联酶聚体的潜在优势^[69]

(b) 交联酶聚体、磁性交联酶聚体与多酶组合交联酶聚体制备^[68,72]

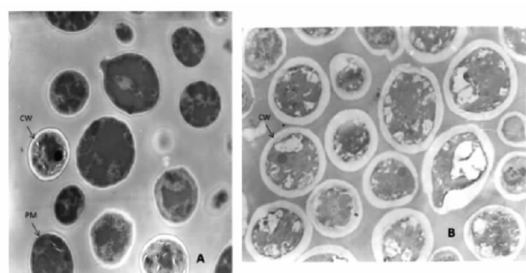
图 5 无载体固定化的研究进展

Fig.5 Research progress of carrier-free immobilization

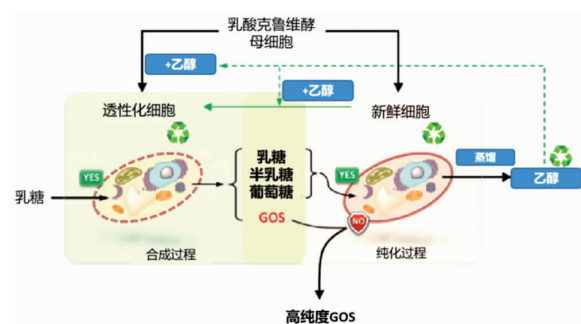
3.3 透性化细胞

多数 β -gal 以胞内酶形式存在,透性化细胞免除复杂的纯化过程,同时避免了载体和无载体固定化酶的活性损失。透性化细胞主要通过物理或化学方法,在保持细胞结构的完整性的情况下改变细胞壁和细胞膜的通透性,使得小分子可以自由出入细胞,从而减少工序,避免酶失活^[73];同时可以通过离心或过滤分离,实现酶的重复使用。目前针对 β -gal 的透性化细胞制备,通常利用乙醇(安全无毒)处理含有胞内酶的细胞,使细胞膜上脂质溶解,使得乳糖、半乳糖、葡萄糖和 GOS 等底物与产物能自由进出全细胞。通过透射电镜观察乳酸克鲁维酵母细胞和透性细胞形态变化(如图 6a)也印证了这一现象:全细胞显示均匀致密的细胞壁和完整的质膜,而透性化细胞并无明显的物理断裂,但是细胞壁与质膜明显消失,表明化学处理明显改变了细胞外壁的通透性,导致胞内成分的释放^[74]。Gobinath 等^[75]针对来自植物乳杆菌 MCC2156 的 β -gal,探究了不同透性化处理条件对活性的影响,同时发现透性化细胞在 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 储存 45 d 后,活性仍能保留 50% 左右,表现出优异的稳定性。

You 等^[76]基于透性化乳酸克鲁维酵母细胞,从



(a) 透射电子显微镜观察到的乳酸克鲁维细胞的外观($\times 6000$)



(b) “一种酵母,两种用途”策略制备高纯度 GOS 的绿色循环工艺开发^[78]

注:A. 对照细胞,B. 肌氨酰渗透酵母细胞(CW:细胞壁;PM:质膜)^[74]。

图 6 透性化细胞工艺技术开发

Fig.6 Permeabilization cell process technology development

4 结语

β -gal 在低聚半乳糖合成生产工艺中的应用是一个持续性的研究热点,本文从酶源和应用形式角度出发,综述了不同来源 β -gal 的应用表现,

发酵环节入手,利用响应面法优化发酵条件,同时开发 pH 值反馈控制发酵策略,大幅提高了透性化细胞的催化活性,优化后酶活达 111.61 U/mL,是目前可知天然菌株中最高值^[77]。同时,研究了联产透性化细胞酶制剂和乙醇的发酵工艺,实现了发酵蒸馏产乙醇,用于透性处理工艺,以获得透性细胞酶制剂和乙醇产品。Sun 等^[78]在此基础上,将催化工艺与发酵纯化法相结合,开发了如图 6b 所示,“一种酵母,两种用途”制备高纯 GOS 的策略,主要分为两个步骤:1) 利用透性化细胞催化乳糖合成 GOS;2) 使用全细胞发酵纯化 GOS 联产乙醇。透性化细胞重复使用至少 14 批次内,GOS 产率依然保持在 35.0% 左右,全细胞的纯化性能在 9 批次内未出现明显下降,由此表明该工艺实现胞内酶乳酸克鲁维酵母的绿色循环利用。该工艺整合了 β -gal 酶制剂高效发酵制备和高纯 GOS 的高效催化制备的完整工艺,可获得高纯 GOS 产品(纯度高于 95%),透性化酶制剂和乙醇,有望在现有生产企业通过简单的设备改造实现,易于产业化衔接。因此,该套完整工艺具备工业化生产高纯度 GOS 的潜在应用价值,也可为其它功能糖产品开发提供技术参考。

同时比较了游离酶、固定化酶制剂与透性化细胞 3 种典型的应用方式,也是目前的研究现状与发展方向。在 β -gal 未来的应用开发方面,对新来源 β -gal 酶学性质的开发与鉴定将成为推进其应用

转化的有力手段;另一方面,通过不同酶源与不同工艺相结合,以适应生产条件的要求,生产所需结构组成的低聚半乳糖产品也是工业上值得开发的方向。同时本文也结合自身工作,总结了“一种酵母,两种用途”工艺成果,在小试工艺规模上用于生产高纯度(>95%)GOS产品,具备高稳定性,高活性和高循环性,具备进一步推进到工业化生产的优秀潜力。

参 考 文 献

- [1] AZCARATE-PERIL M A, RITTER A J, SAVIANO D, et al. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(3): E367-E375.
- [2] GOSLING A, STEVENS G W, BARBER A R, et al. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose[J]. Food Chem, 2010, 121(2): 307-318.
- [3] AKKERMAN R, FAAS M M, DE VOS P. Non-digestible carbohydrates in infant formula as substitution for human milk oligosaccharide functions: Effects on microbiota and gut maturation[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(9): 1486-1497.
- [4] KNOL J, SCHOLTENS P, KAFKA C, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: More like breast-fed infants[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005, 40(1): 36-42.
- [5] CHEN Q C, LIU M, ZHANG P Y, et al. Fucoidan and galactooligosaccharides ameliorate high-fat diet-induced dyslipidemia in rats by modulating the gut microbiota and bile acid metabolism[J]. Nutrition, 2019, 65: 50-59.
- [6] KRUMBECK J A, RASMUSSEN H E, HUTKINS R W, et al. Probiotic Bifidobacterium strains and galactooligosaccharides improve intestinal barrier function in obese adults but show no synergism when used together as synbiotics[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 121.
- [7] MUIR J G, ROSE R, ROSELLA O, et al. Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(2): 554-565.
- [8] MARTINEZ-FEREZ A, GUADIX A, GUADIX E M. Recovery of caprine milk oligosaccharides with ceramic membranes[J]. J Membr Sci, 2006, 276(1/2): 23-30.
- [9] HUH K T, TOBA T, ADACHI S. Oligosaccharide structures formed during acid hydrolysis of lactose[J]. Food Chem, 1991, 39(1): 39-49.
- [10] HANSSON T, KAPER T, VAN DER OOST J, et al. Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of beta-glucosidase CelB from hyperthermophilic Pyrococcus furiosus[J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 73(3): 203-210.
- [11] DE ROODE B M, FRANSSSEN M C R, VAN DER PADT A, et al. Perspectives for the industrial enzymatic production of glycosides[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19(5): 1391-1402.
- [12] OSMAN A, TZORTZIS G, RASTALL R A, et al. High Yield Production of a Soluble Bifidobacterial beta-Galactosidase (BbgIV) in E. coli DH5 alpha with Improved Catalytic Efficiency for the Synthesis of Prebiotic Galactooligosaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(9): 2213-2223.
- [13] RODRIGUEZ-COLINAS B, DE ABREU M A, FERNANDEZ-ARROJO L, et al. Production of Galacto-oligosaccharides by the beta-Galactosidase from Kluyveromyces lactis: Comparative Analysis of Permeabilized Cells versus Soluble Enzyme[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19): 10477-10484.
- [14] KOSHLAND D E J R. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions[J]. Biological Reviews, 2010, 28(4): 416-436.
- [15] LU L, GUO L, WANG K, et al. β -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates[J]. Biotechnology Advances, 2020, 39: 107465.
- [16] VERA C, GUERRERO C, ABURTO C, et al. Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2020, 1868(1): 140271.

- [17] VERA C, GUERRERO C, ILLANES A. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations[J]. *Carbohydr Res*, 2011, 346(6): 745-752.
- [18] 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.
- [19] MARTINS G N, URETA M M, TYMCZYSZYN E E, et al. Technological Aspects of the Production of Fructo and Galacto-Oligosaccharides. Enzymatic Synthesis and Hydrolysis[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2019, 6.
- [20] URRUTIA P, RODRIGUEZ-COLINAS B, FERNANDEZ-ARROJO L, et al. Detailed Analysis of Galactooligosaccharides Synthesis with beta-Galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2013, 61(5): 1081-1087.
- [21] CAREVIC M, VUKASINOVIC-SEKULIC M, COROVIC M, et al. Evaluation of beta-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* as biocatalyst for galacto-oligosaccharides synthesis: Product structural characterization and enzyme immobilization[J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126(6): 697-704.
- [22] YANAHIRA S, KOBAYASHI T, SUGURI T, et al. Formation of oligosaccharides from lactose by *Bacillus circulans* beta-galactosidase[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(6): 1021-1026.
- [23] GIESE E C, HIROSI T, DA SILVA M D C, et al. Production, properties and applications of oligosaccharides[J]. *Semin-Cienc Agrar*, 2011, 32(2): 683-699.
- [24] FUREDER V, RODRIGUEZ-COLINAS B, CERVANTES F V, et al. Selective Synthesis of Galactooligosaccharides Containing beta (1→3) Linkages with beta-Galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* (Saphera)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(17): 4930-4938.
- [25] VERA C, CORDOVA A, ABURTO C, et al. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2016, 32(12).
- [26] BENJAMINS E, BOXEM L, KLEINJAN-NOEVERMAN J, et al. Assessment of repetitive batch-wise synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose slurry using immobilised beta-galactosidase from *Bacillus circulans*[J]. *Int Dairy J*, 2014, 38(2): 160-168.
- [27] NGUYEN T H, SPLECHTNA B, KRASTEVA S, et al. Characterization and molecular cloning of a heterodimeric beta-galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 269(1): 136-144.
- [28] FRENZEL M, ZERGE K, CLAWIN-RADECKER I, et al. Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different beta-galactosidases[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 60(2): 1068-1071.
- [29] GOULAS A, TZORTZIS G, GIBSON G R. Development of a process for the production and purification of alpha- and beta-galactooligosaccharides from *Bifobacterium bifidum* NCIMB 41171[J]. *Int Dairy J*, 2007, 17(6): 648-656.
- [30] CINAR K, GUNES G, GULEC H A. Enzymatic synthesis of prebiotic carbohydrates from lactose: Kinetics and optimization of transgalactosylation activity of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. *J Food Process Eng*, 2020, 43(8): 1-12.
- [31] GOSLING A, ALFTREN J, STEVENS G W, et al. Facile pretreatment of *Bacillus circulans* beta-galactosidase Increases the yield of galactosyl oligosaccharides in milk and lactose reaction systems[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(24): 11570-11574.
- [32] RODRIGUEZ-COLINAS B, POVEDA A, JIMENEZ-BARBERA J, et al. Galacto-oligosaccharide Synthesis from Lactose Solution or Skim Milk Using the beta-Galactosidase from *Bacillus circulans*[J]. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2012, 60(25): 6391-6398.
- [33] JOVANOVIC-MALINOVSKA R, FERNANDES P, WINKELHAUSEN E, et al. Galacto-oligosaccharides Synthesis from Lactose and Whey by beta-Galactosidase Immobilized in PVA[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168(5): 1197-1211.
- [34] SPLECHTNA B, NGUYEN T-H, ZEHETNER R, et al. Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidase from *Lactobacillus* sp[J]. *Biotechnology Journal*, 2007, 2(4): 480-485.

- [35] SPLECHTNA B, NGUYEN T H, STEINBOCK M, et al. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(14): 4999-5006.
- [36] KITTIBUNCHAKUL S, VAN LEEUWEN S S, DIJKHUIZEN L, et al. Structural comparison of different galacto-oligosaccharide mixtures formed by beta-galactosidases from lactic acid bacteria and bifidobacteria [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(15): 4437-4446.
- [37] VERA C, GUERRERO C, CONEJEROS R, et al. Synthesis of galacto-oligosaccharides by beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose[J]. Enzyme Microb Technol, 2012, 50(3): 188-194.
- [38] FISCHER C, KLEINSCHMIDT T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate[J]. Int Dairy J, 2015, 48: 15-22.
- [39] 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.
- [40] 王卿卿, 冯惠勇, 康辉, 等. 耐高温 β -糖苷酶的乳糖水解活性及转糖基活性[J]. 生物加工过程, 2009, 7(1): 49-53.
- WANG Q Q, FENG H Y, KANG H, et al. Activities of thermostable beta-glucosidase in lactose hydrolysis and transgalactosylation[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2009, 7(1): 49-53.
- [41] MARTINEZ-VILLALUENGA C, CARDELLE-COBAS A, OLANO A, et al. Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(2): 557-563.
- [42] WARMERDAM A, PAUDEL E, JIA W Q, et al. Characterization of beta-Galactosidase Isoforms from *Bacillus circulans* and Their Contribution to GOS Production[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 170(2): 340-358.
- [43] FRENZEL M, ZERGE K, CLAWIN-R?DECKER I, et al. Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β -galactosidases[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 60(2, Part 1): 1068-1071.
- [44] NERI D F M, BALCAO V M, DOURADO F O Q, et al. Galactooligosaccharides production by beta-galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane-polyaniline particles[J]. React Funct Polym, 2009, 69(4): 246-251.
- [45] VERA C, GUERRERO C, ILLANES A, et al. Fed-batch synthesis of galacto-oligosaccharides with *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase using optimal control strategy[J]. Biotechnology Progress, 2014, 30(1): 59-67.
- [46] FISCHER C, KLEINSCHMIDT T. Combination of two beta-galactosidases during the synthesis of galactooligosaccharides may enhance yield and structural diversity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 506(1): 211-215.
- [47] FERREIRA-LAZARTE A, GALLEGO-LOBILLO P, JAVIER MORENO F, et al. *In vitro* digestibility of galactooligosaccharides: Effect of the structural features on their intestinal degradation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(16): 4662-4670.
- [48] MARTINEZ-VILLALUENGA C, CARDELLE-COBAS A, CORZO N, et al. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G)[J]. Food Chem, 2008, 107(1): 258-264.
- [49] FISCHER C, KLEINSCHMIDT T. Effect of glucose depletion during the synthesis of galactooligosaccharides using a trienzymatic system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 121: 45-50.
- [50] 董艺凝, 陈海琴, 刘小鸣, 等. 耐热 β -半乳糖苷酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(1): 384-387.
- DONG Y N, CHEN H Q, LIU X M, et al. Research progress in thermostable β -galactosidases[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(1): 384-387.
- [51] JENAB E, OMIDGHANE M, MUSSONE P, et al. Enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides: The effect of process parameters, kinetics, foam architecture, and product characterization[J]. J Food Eng, 2018, 222: 63-72.
- [52] OTIENO D O. Synthesis of beta-Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial beta-Galactosidases[J]. Comprehensive Reviews In Food Science

- And Food Safety, 2010, 9(5): 471–482.
- [53] 陈真真, 张涛, 江波, 等. 低聚半乳糖酶法合成条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(10): 35–39.
- CHEN Z Z, ZHANG T, JIANG B, et al. Study on enzymatic synthesis conditions of galactooligosaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(10): 35–39.
- [54] KONG F S, WANG Y Q, CAO S G, et al. Cloning, purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase from *Thermotoga naphthophila* RUK-10 [J]. Process Biochem, 2014, 49(5): 775–782.
- [55] XIN Y P, GUO T T, ZHANG Y, et al. A new beta-galactosidase extracted from the infant feces with high hydrolytic and transgalactosylation activity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(20): 8439–8448.
- [56] LI D, LI S, WU Y, et al. Cloning and characterization of a new β -Galactosidase from *alteromonas* sp. QD01 and its potential in synthesis of galactooligosaccharides [J]. Marine Drugs, 2020, 18(6): 312.
- [57] 汤卫华, 王立晖, 殷海松, 等. 壳聚糖微球固定化 β -半乳糖苷酶[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(5): 105–109.
- TANG W H, WANG L H, YIN H S, et al. The immobilization of β -galactosidase on chitosan microspheres[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(5): 105–109.
- [58] SU Z, LUO J, LI X, et al. Enzyme membrane reactors for production of oligosaccharides: A review on the interdependence between enzyme reaction and membrane separation[J]. Separation and Purification Technology, 2020, 243: 116840.
- [59] REN H, FEI J, SHI X, et al. Continuous ultrafiltration membrane reactor coupled with nanofiltration for the enzymatic synthesis and purification of galactosyl-oligosaccharides[J]. Separation and Purification Technology, 2015, 144: 70–79.
- [60] SU Z R, LUO J Q, LI X H, et al. Enzyme membrane reactors for production of oligosaccharides: A review on the interdependence between enzyme reaction and membrane separation[J]. Sep Purif Technol, 2020, 243.
- [61] MISSON M, JIN B, CHEN B H, et al. Enhancing enzyme stability and metabolic functional ability of beta-galactosidase through functionalized polymer nanofiber immobilization[J]. Bioprocess And Biosystems Engineering, 2015, 38(10): 1915–1923.
- [62] SASS A C, JORDENING H J. Immobilization of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* on electrospun gelatin nanofiber mats for the production of galactooligosaccharides[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2020, 191(3): 1155–1170.
- [63] MULINARI J, OLIVEIRA J V, HOTZA D. Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials[J]. Biotechnology Advances, 2020, 42: 107581.
- [64] GONZALEZ-DELGADO I, SEGURA Y, MARTIN A, et al. Beta-galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS)[J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2018, 257: 51–61.
- [65] CHEN S C, DUAN K J. Production of galactooligosaccharides using beta-galactosidase immobilized on chitosan-coated magnetic nanoparticles with tris(hydroxymethyl)phosphine as an optional coupling agent[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(6): 12499–12512.
- [66] LIU J F, LIU H, TAN B, et al. Reversible immobilization of *K. fragilis* beta-galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide[J]. J Mol Catal B-Enzym, 2012, 82: 64–70.
- [67] MULINARI J, OLIVEIRA J V, HOTZA D. Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials[J]. Biotechnol Adv, 2020, 42.
- [68] CUI J D, JIA S R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges[J]. Crit Rev Biotechnol, 2015, 35(1): 15–28.
- [69] BILAL M, ZHAO Y P, NOREEN S, et al. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: a review from immobilization strategies viewpoint[J]. Biocatal Biotransform, 2019, 37(3): 159–182.
- [70] 孙槐胜, 邢肖肖, 齐崑, 等. β -半乳糖苷酶磁性交联酶聚体的制备及性质研究[J]. 南开大学学报(自然

- 科学版), 2016, 49(3): 18-24.
- SUN H S, XING X X, QI W, et al. The preparation and properties of magnetic cross-linked beta-galactosidase aggregates[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2016, 49(3): 18-24.
- [71] LI L, LI G, CAO L C, et al. Characterization of the cross-linked enzyme aggregates of a novel beta-galactosidase, a potential catalyst for the synthesis of galacto-oligosaccharides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(3): 894-901.
- [72] SHELDON R A, PEREIRA P C. Biocatalysis engineering: the big picture[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(10): 2678-2691.
- [73] 杨大娇, 任天宝, 王风芹, 等. 静息细胞在发酵工业中的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(8): 187-191.
- YANG D J, REN T B, WANG F Q, et al. The research progress of resting cell fermentation production of industry[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(8): 187-191.
- [74] VOGET C E. Recovery of beta-galactosidase from the yeast *Kluyveromyces lactis* by cell permeabilization with sarkosyl[J]. *Process Biochem*, 2018, 75: 250-256.
- [75] GOBINATH D, PRAPULLA S G. Transgalactosylating beta-galactosidase from probiotic *Lactobacillus plantarum* MCC2156: production and permeabilization for use as whole cell biocatalyst[J]. *J Food Sci Technol-Mysore*, 2015, 52(9): 6003-6009.
- [76] YOU S P, CHANG H X, YIN Q D, et al. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of beta-galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1271-1276.
- [77] YOU S P, WANG X N, QI W, et al. Optimisation of culture conditions and development of a novel fed-batch strategy for high production of beta-galactosidase by *Kluyveromyces lactis*[J]. *Int J Food Sci Technol*, 2017, 52(8): 1887-1893.
- [78] SUN H S, YOU S P, WANG M F, et al. Recyclable strategy for the production of high-purity galacto-oligosaccharides by *Kluyveromyces lactis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(28): 5679-5685.

Advances in the Production of Galacto-oligosaccharides Based on β -Galactosidase

Wu Hao¹, Qi Wei^{1,2,3*}, You Shengping^{1,3}, Su Rongxin^{1,2,3}, He Zhimin^{1,2}

¹*School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072*

²*State Key Laboratory of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072*

³*Tianjin Key Laboratory of Membrane Science and Desalination Technology, Tianjin University, Tianjin 300072*

Abstract Galacto-oligosaccharides (GOS) is a natural functional food ingredient widely present in human breast milk. The production of GOS by β -Galactosidase is main commercial source. β -Galactosidase is a kind of important glycoside hydrolase, which has the ability to simultaneously catalyze the hydrolysis reaction and the transglycoside reaction. Due to the complexity of the source and application of β -Galactosidase, the corresponding GOS products are very different in structure and purity. Therefore, the research of β -galactosidase oriented to high-yield and high-purity GOS has been receiving extensive attention. This review compares the performance of β -Galactosidase in the process of catalyzing GOS from the perspectives of mechanism analysis, enzyme sources, and catalytic methods. On this basis, the research direction of β -Galactosidase in the production of GOS is prospected.

Keywords galacto-oligosaccharides; β -galactosidase; transglycoside reaction; immobilization; permeation