

β -半乳糖苷酶的来源、改造、异源表达及其在食品中的应用

李云亮, 谢鹏飞, 刘晓霜, 晁嘉品, 赵晓雪, 王晓静, 马海乐

Source, Modification, Heterologous Expression of β -Galactosidase and Its Application in Food

LI Yunliang, XIE Pengfei, LIU Xiaoshuang, CHAO Jiapin, ZHAO Xiaoxue, WANG Xiaojing, and MA Haile

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030097>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大豆胰蛋白酶抑制剂的异源表达与生化特性解析

Heterologous Expression and Biochemical Characterization of Soybean Trypsin Inhibitor

食品工业科技. 2018, 39(24): 134-138 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.24.024>

Geobacillus thermodenitrificans α -半乳糖苷酶原核表达及其酶学性质

Prokaryotic Expression and Enzymatic Properties of α -galactosidase from *Geobacillus thermodenitrificans*

食品工业科技. 2019, 40(10): 179-183 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.030>

一种高耐热普鲁兰酶的克隆表达、酶学性质及其在粉丝制作中的应用

Cloning, Expression and Characterization of a Hyper-thermophilic Pullulanase and Its Application in Vermicelli Processing

食品工业科技. 2020, 41(5): 113-118,123 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.019>

脂肪酶固定化及其在食品领域中应用的研究进展

Research Progress of Lipase Immobilization and Its Application in Food Field

食品工业科技. 2021, 42(17): 423-431 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080096>

基因共表达对人源LysoPLD异源可溶性表达、纯化及酶学性质的影响

Effect of Gene Co-expression on Heterologous Soluble Expression, Purification and Enzymatic Properties of Human LysoPLD

食品工业科技. 2021, 42(7): 102-109 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060091>

红枣环磷酸腺苷的研究进展

Research progress in c AMP from red jujube

食品工业科技. 2017(19): 332-336 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.061>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李云亮, 谢鹏飞, 刘晓霜, 等. β -半乳糖苷酶的来源、改造、异源表达及其在食品中的应用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 387-393. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030097

LI Yunliang, XIE Pengfei, LIU Xiaoshuang, et al. Source, Modification, Heterologous Expression of β -Galactosidase and Its Application in Food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 387-393. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030097

· 专题综述 ·

β -半乳糖苷酶的来源、改造、异源表达及其在食品中的应用

李云亮^{1,2}, 谢鹏飞¹, 刘晓霜¹, 晁嘉品¹, 赵晓雪¹, 王晓静¹, 马海乐^{1,2,*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212000;

2. 卫仕宠物营养科学研究院(江苏)有限公司, 江苏镇江 212000)

摘要: β -半乳糖苷酶作为一种安全无毒的酶制剂, 不仅广泛应用于食品工业领域中, 而且在酶工程、蛋白质工程等生物技术领域也有着很大的应用潜力。微生物发酵法作为生产 β -半乳糖苷酶的主流生产方法, 仍存在发酵时间较长、提取率低等问题; 而利用工程菌的异源表达系统生产 β -半乳糖苷酶的方式具有表达量高、成本低等优点。本文对 β -半乳糖苷酶异源表达系统的基因来源、表达宿主菌、表达方式以及 β -半乳糖苷酶应用价值等进行阐述, 旨在为新型 β -半乳糖苷酶产品的开发利用提供科学依据与理论参考。

关键词: β -半乳糖苷酶, 应用价值, 基因改造, 固定化, 异源表达

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0387-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030097



本文网刊:

Source, Modification, Heterologous Expression of β -Galactosidase and Its Application in Food

LI Yunliang^{1,2}, XIE Pengfei¹, LIU Xiaoshuang¹, CHAO Jiapin¹, ZHAO Xiaoxue¹,
WANG Xiaojing¹, MA Haile^{1,2,*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China;

2. Weishi Pet Nutrition Research Institute (Jiangsu) Co., Ltd., Zhenjiang 212000, China)

Abstract: β -galactosidase, as a safe and nontoxic enzyme preparation, has been not only widely used in food industry and medical fields, but also has great application potential in biotechnology fields, such as enzyme engineering and protein engineering. Microbial fermentation, as a mainstream production method of β -galactosidase, still has some problems including long fermentation time and low extraction rate. While using the heterologous expression system of engineering bacteria to produce β -galactosidase shows the advantages of high expression quantity and low cost. This paper focuses on the gene source, expression host bacteria, expression methods of β -galactosidase heterologous expression system and its application value, to be aimed at providing scientific basis and theoretical reference for the development and utilization of novel β -galactosidase products.

Key words: β -galactosidase; application value; gene modification; immobilization; heterologous expression

β -半乳糖苷酶(β -galactosidase EC.3.2.1.23), 全称为 β -D-半乳糖苷半乳糖水解酶, 可通过切割乳糖中由 β -1-4-糖苷键连接的 D-半乳糖残基, 使乳糖降

解成为可被机体吸收的 β -半乳糖和葡萄糖^[1]。 β -半乳糖苷酶来源丰富^[2], 广泛存在于哺乳动物、植物和微生物中。在幼年哺乳动物的皮肤、特别是小肠等

收稿日期: 2023-03-09

基金项目: 国家自然科学基金-青年项目(31701538); 江苏省卓越博士后计划资助(2023ZB055)。

作者简介: 李云亮(1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: liyunliang@ujs.edu.cn。

* 通信作者: 马海乐(1963-), 男, 博士, 二级教授, 研究方向: 食品物理加工技术, E-mail: mhl@ujs.edu.cn。

器官组织中存在丰富的 β -半乳糖苷酶^[3-4], 而成年个体的消化道内 β -半乳糖苷酶含量较低, 无法很好地分解和利用乳糖; 虽然很多食物、植物中均发现了 β -半乳糖苷酶, 如番茄^[5]、水稻^[6]、拟南芥^[7]、苹果^[8]和咖啡豆^[9]等, 然而植物来源的 β -半乳糖苷酶在组织中含量并不高, 因此提取得率较低^[10]; 微生物中 β -半乳糖苷酶资源很丰富, 大肠杆菌、酵母菌、霉菌等细菌、真菌均能产 β -半乳糖苷酶。

目前商业化使用的 β -半乳糖苷酶主要采用大肠杆菌、黑曲霉等微生物发酵法制备, 但存在酶活不高、稳定性较差等问题, 且很多微生物发酵产物多以胞内酶的形式存在, 导致酶纯化工艺复杂、成本增加。为解决此类问题, 研究学者对 β -半乳糖苷酶基因进行异源表达, 或者将其改造后再进行异源表达, 即将 β -半乳糖苷酶基因转入至外源宿主菌^[11]中, 利用宿主细胞自身代谢资源(能量分子、氨基酸等)来实现表达^[12], 展现了良好的应用前景。基于此, 本文对 β -半乳糖苷酶的应用、 β -半乳糖苷酶基因的来源及其异源表达、表达宿主和表达方式展开综合论述, 为 β -半乳糖苷酶的开发与改良提供科学依据与理论参考。

1 β -半乳糖苷酶的来源及改造

1.1 β -半乳糖苷酶来源

目前 NCBI 中登记的 β -半乳糖苷酶基因已有 1.7 万余个, 图 1 中显示真核生物共 12188 个、细菌 4393 个、古生菌 415 个以及病毒 19 个(截止 2023. 04. 06)。同一家族来源的 β -半乳糖苷酶具有相似的催化机制, 不同家族来源的 β -半乳糖苷酶则在酶学性质上有着较大差异, 表 1 列出了较为常见的不同来源的 β -半乳糖苷酶特性。贺璐等^[13]发现细菌来源的 β -半乳糖苷酶多为常温酶, 如大肠杆菌和保加利亚乳杆菌来源的 β -半乳糖苷酶最适反应温度一般在 40 °C 左右, 最适作用 pH 在 6.5~7.5 之间。酵母菌来源的 β -半乳糖苷酶具有较强的水解活性^[14], 常用于牛乳和乳清中乳糖的水解。霉菌来源的 β -半乳糖苷酶最适反应温度通常在 50 °C 以上, 最适 pH 偏酸

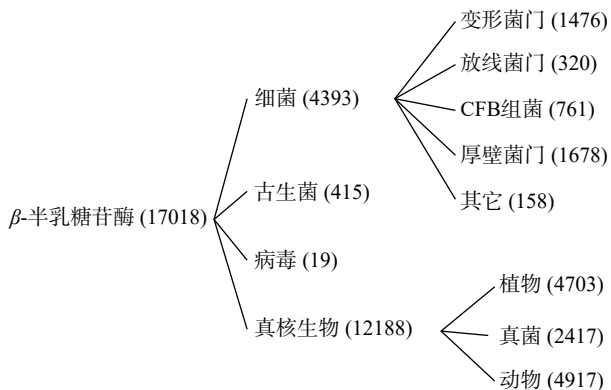


图 1 已登记 β -半乳糖苷酶基因来源(截止 2023. 04. 06)

Fig.1 Registered gene sources of β -galactosidase (until 2023. 04. 06)

性, 其中黑曲霉^[15]来源的 β -半乳糖苷酶耐热耐酸性较强, 可用于干酪、牛乳和酸性乳清的水解处理, 而米曲霉^[16]来源的 β -半乳糖苷酶则具有较强的转糖基活性, 可用于生产低聚半乳糖。

表 1 不同来源 β -半乳糖苷酶特性
Table 1 Characteristics of β -galactosidase from different sources

来源	分子量 (kDa)	最适温度 (°C)	最适pH	酶活力 (U·mg ⁻¹)
大肠杆菌 ^[17]	540	40	7.2	430
保加利亚乳杆菌 ^[18]	220	42~45	7.0	NT
嗜热乳酸杆菌 ^[19]	530	55~57	6.2~7.5	530
嗜热脂肪芽孢杆菌 ^[20]	215	65	6.0~6.4	215
乳酸克鲁维酵母 ^[21]	135	35	6.9~7.3	135
脆壁克鲁维酵母 ^[22]	201	37	6.6	201
黑曲霉 ^[23]	124	55~60	2.5~4.0	142
米曲霉 ^[24]	90	50~55	5.0	90
蚕豆 ^[25]	70	50	4.0	NT
番茄 ^[5]	71	50~55	4.0~4.4	16
狗头枣 ^[26]	35~70	50	4.5	70
猪 ^[3]	31~37	50~55	4.0	NT
山羊 ^[27]	22~17	50	3.5~4.5	NT
皱瘤海鞘 ^[25]	69	75~77	4.0	NT

注: NT: Not Taken, 即文献中未记录的数据。

1.2 β -半乳糖苷酶改造

天然微生物以及动植物中的 β -半乳糖苷酶存在热稳定性差、酶活低等问题, 往往不能很好地满足目前工业发展需求, 可通过分子进化手段对 β -半乳糖苷酶基因进行定向改造, 将其在体外模拟随机突变^[28]、重组, 使得目的基因发生大量变异, 筛选获得具有特定性质的目的基因。彭慧等^[29]将来源于 *T.scotoductus* 的野生型 β -半乳糖苷酶 GalT0 的 N 端氨基酸序列插入一个经过人工改造的双亲短肽序列 (AEAEAKAKAEAEAKAKAEAEAKAK), 经改造后的 β -半乳糖苷酶, 稳定性更高, 55 °C 环境下半衰期提高了 10 倍, 2 h 内可水解牛奶中 95% 的乳糖。杨萍^[30]通过将来源于米曲酶的乳糖酶基因作为出发点, 通过 PCR 引物设计, 对基因序列中第 211 位氨基酸进行改造, 将 Thr 突变为 Asn、Asp、Ser、Pro 和 Gly, 发现当第 211 位氨基酸突变为 Pro 后, 在 60 °C 环境下的半衰期相对于野生型的 2.06 min 提高到 177.73 min, 极大地改良了乳糖酶的热稳定性。对 β -半乳糖苷酶基因的改造不仅局限于使其具有更广泛的环境适应范围, 还可以增加自身表达水平、提高酶活力。李晨霞等^[31]通过易错 PCR 技术构建了米曲霉 β -半乳糖苷酶(AoBgal35A)的突变体文库^[32]并对其进行分析, 发现 AoBgal35A 中第 955 位的苏氨酸(Thr)突变为丙氨酸(Ala), 使得极性残基突变为非极性残基, 最终获得的 β -半乳糖苷酶的最适 pH 提高了 0.5, 酶活达 4760 U/mL, 是目前米曲酶来源的 β -半乳糖苷酶基因在毕赤酵母中获得的最高表达水

平。目前随着研究的不断深入, 日趋成熟和完善的多种新型分子进化技术如 DNA 改组^[33]、易错 PCR^[34]、交错延伸等方法将有望成为 β -半乳糖苷酶基因改造的有效工具。

2 β -半乳糖苷酶的异源表达系统

选择合适的表达系统是使 β -半乳糖苷酶基因得以高效表达的关键因素, 目前 β -半乳糖苷酶异源表达的系统主要分为原核生物和真核生物表达系统, 表 2 列出了目前常用的表达系统及其特点。

2.1 原核表达系统

原核表达系统中最常见的是大肠杆菌表达系统^[40], 大肠杆菌生长速度极快, 具有连续发酵的能力, 以及表达量高、生产成本低^[41]、遗传背景清晰^[42]等特点, 利用其作为表达宿主表达 β -半乳糖苷酶基因, 技术路线成熟、可行性高^[43]。陈卫等^[44]将来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的 β -半乳糖苷酶基因连接至大肠杆菌表达载体 pET-20b 中, 转化至大肠杆菌 BL21 中诱导表达的重组蛋白比酶活为 6.66 U/mg 蛋白, 相比于出发菌株提高了 50 倍。徐顺清等^[45]将来源于乳酸克鲁维酵母的乳糖酶基因克隆至大肠杆菌表达载体 pET-28a(+) 上, 转化至大肠杆菌 BL21 后 28 °C 诱导 4.5 h, 测得乳糖酶酶活为 44.78 U/mL 发酵液, 但在添加 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 CO_2^{+} 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 金属离子后, 酶活分别提高了 18.53%、54.49%、293.65%、347.56%、422.95% 和 549.81%, 而 Cu^{2+} 的添加使得酶活完全被抑制, 这为之后完善 β -半乳糖苷酶发酵体系提供了理论依据。利用大肠杆菌表达系统生产 β -半乳糖苷酶时, 若稀有密码子连续出现, 则会一直蛋白质的合成, 发生密码子错配等现象, 所以可在基因的设计前进行密码子的优化, 如非连续性多核苷酸定点突变法对 cDNA 中稀有密码子进行定点突变, 或提高某种氨基酸的 tRNA 浓度等。此外, 蛋白在表达过程中会存在内毒素等有害物质残留风险, 限制了其在食品领域的应用, 所以食品级表达系统的建立对 β -半乳糖苷酶的生产也是十分重要的。

乳酸菌, 如乳酸乳球菌、乳杆菌和嗜热链球菌等属于安全的益生菌^[46], 利用其作为表达的宿主菌, 具有较高的安全性, 近些年来该表达系统正成为研究的热点。孙芝兰等^[47]将 *Paenibacillus* sp. K1 乳糖酶基

因构建至载体 pSEC 和 Pmg36e 上, 电击转化至乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* MG1614) 中, 其表达后获得的 β -半乳糖苷酶对 1% 的乳糖进行发酵, 乳糖残余量为 0.56%, 水解率增加一倍。由于乳酸乳球菌具有较高的食品安全特性, 可使用其系统进行食品工业中相关蛋白酶制剂的开发。乳酸菌表达系统大多都是胞内表达, 自身也存在分泌困难^[48]等问题, 而芽孢杆菌表达系统与乳酸菌表达系统相比, 具备较强的分泌高活性蛋白的能力^[49]。许俊勇等^[50]首次将来源于环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*) 的 β -半乳糖苷酶基因在枯草芽孢中进行异源表达, 经过 3 L 罐的高密度培养, 最终获得的酶活为 138.29 U/mL, 是普通摇瓶发酵的 20.3 倍。

利用上述原核表达系统表达的 β -半乳糖苷酶以游离酶的形式表达时, 可采用酶固定化的方法增强其稳定性和重复使用性, 如包埋法^[51]、吸附法^[52]等, 但这些方法存在操作过程复杂、成本较高的缺点。为了简化工艺, 酶自固定化法应运而生, 自固定化指的是酶(或融合酶)在特定条件下, 自发形成不溶状态的过程, 可采取将含有水不溶性的融合标签基因和可溶性酶基因组合在一起, 使酶以不溶性包涵体的形式表达。王晓静^[53]以李云亮^[54]构建的金枪鱼多肽 TunaAI 32 聚体基因为基础设计出了两种水不溶性的融合标签基因, 并与乳糖酶基因进行融合表达, 该自固定化乳糖酶的热稳定性比市售乳糖酶更强, 在 60 °C 保温 1 h 后相对酶活仍达到 57.35%, 其在低温环境中储藏 10 d, 仍可保持 90% 以上的酶活, 展示出了良好的应用前景。因此自固定化融合标签开发和设计可成为今后科研人员的研究重点之一。

2.2 真核表达系统

真核表达系统相对于原核表达系统具有翻译后的加工修饰功能^[49], 内部具有严格调控基因^[55]的能力, 表达的外源蛋白更接近于天然蛋白质, 利用这一特点, 真核表达系统常被用于具有复杂结构蛋白质的表达, 其中以酵母表达系统最为常见^[56]。王敏等^[57]将来源于米曲酶 β -半乳糖苷酶的基因片段转化至乳酸克鲁维酵母 GG799 中, 在连续发酵 120 h 后, 获得的蛋白酶活为 120.65 U/mL, 由于 Pklac1 载体含有真菌乙酰胺酶基因, 发酵过程中不用添加任何抗生

表 2 常见表达系统特点

Table 2 Characteristics of common expression systems

表达系统类型	具体表达系统	常用宿主	适用范围	优点	缺点
原核表达系统	大肠杆菌表达系统 ^[35]	BL21、Rosetta	蛋白质、抗体的生产	遗传背景清晰、成本低、适合大规模培养	易形成包涵体
	枯草芽孢表达系统 ^[36]	枯草芽孢杆菌	工业酶制剂的生产	蛋白分泌能力强且不含有内毒素	表达质粒较不稳定
	乳酸菌表达系统 ^[37]	乳酸球菌、乳酸杆菌	食品工业中蛋白酶制剂的开发	安全、操作简单	穿梭载体转化效率低
真核表达系统	哺乳动物表达系统 ^[38]	哺乳动物细胞	重组蛋白药物的生产	能够指导蛋白质正确折叠	细胞株稳定性差、生产成本较高
	酵母表达系统 ^[39]	粟酒裂殖酵母、酿酒酵母	酿酒行业、面包生产	具有翻译后加工能力	蛋白表达量较低

素,获得的 β -半乳糖苷酶经过超滤即可获得较纯酶液,简化了后期处理过程。而酿酒酵母作为表达宿主也适合用于酿酒工业和面包等食品的生产加工过程中。酵母表达系统虽增加了蛋白胞外分泌的可能性,使得蛋白纯化过程相对于胞内表达系统更加容易,但酵母表达系统也存在着分泌蛋白量少,发酵密度低的问题。

而在哺乳动物表达系统中,可采用哺乳动物细胞作为表达宿主,通过其表达的外源蛋白接近于天然蛋白质,可用于重组药物的生产中,但在表达过程中,外源蛋白的生物学活性与宿主免疫原性有时也会产生差别,导致蛋白不能持久稳定表达。此外,此系统所用的表达宿主价格较为昂贵,不太符合大规模对于 β -半乳糖苷酶的工业化生产中。对于真菌表达系统,由于表达自身半乳糖苷酶系(α -型和 β -型)的能力比较强,利用该类型宿主表达经改造后 β -半乳糖苷酶具有很大的价值,但目前相关研究较少,未来有必要对真菌表达系统开展深入研究,为其工业化应用打下基础。

3 β -半乳糖苷酶在食品中的应用

根据我国食品添加剂使用卫生标准 GB 1886.174-2016^[58],黑曲霉来源的 β -半乳糖苷酶可以作为食品添加剂进行使用。 β -半乳糖苷酶作为安全性较高的生物酶制剂,其水解乳糖活性及转糖基活性使其在食品工业等领域大有作为。

3.1 缓解乳糖不耐症问题

乳糖不耐症是由负责消化乳糖的肠道 β -半乳糖苷酶的活性减少或丧失引起的一种疾病,其以乳糖吸收不良为特征,可能导致腹鸣、腹痛、腹泻和肠胃胀气等临床症状,在哺乳动物中普遍发生于羔羊、仔猫和仔犬等各种幼仔中。据统计在人体内 β -半乳糖苷酶的活性随年龄的增长而下降,少数人完全乳糖不耐受,成年人体内 β -半乳糖苷酶的活性仅为正常婴幼儿的5%~10%^[59]。目前最有效的方法是在乳制品生产过程中添加 β -半乳糖苷酶以分解乳糖,制备低乳糖或者无乳糖的牛奶产品^[60]。刘杰等^[61]在牛乳中添加0.65%的 β -半乳糖苷酶反应2 h可水解72.48%的乳糖,并与益生菌微胶囊混合制备了新型低乳糖益生菌乳粉。我国目前市面上的低乳糖奶制品^[62]有零乳糖牛奶、无乳糖舒化奶等,都是通过生牛乳中添加 β -半乳糖苷酶的方式降低乳糖含量。

3.2 生产低聚半乳糖

低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)作为一种益生因子调理肠胃功能、可被肠道内青春双歧杆菌^[63]、两歧双歧杆菌^[64]、婴儿双歧杆菌^[65]、长双歧杆菌^[66]、短双歧杆菌^[67]、干酪乳杆菌^[68]、嗜酸乳杆菌^[69]、唾液乳杆菌^[70]等八种益生菌所利用,抑制有害菌的生长、维持肠道菌群生态平衡^[71]、减少肠易激综合症的发生^[72],起到提高人体免疫力的作用^[73],极具市场开发价值。GOS主流制备方法是酶法,即利用

乳糖为原料,经 β -半乳糖苷酶催化水解及转半乳糖苷的作用,从而形成了由葡萄糖与乳糖组成的混合杂质低聚糖^[74]。吴昊^[75]研究了 β -半乳糖苷酶在 Mg^{2+} 作用下,GOS的生产率为31.37%远高于对照组,同时将GOS与抹茶粉进行复合,也解决了抹茶饮料沉淀的问题。据研究表明GOS不仅作为肠道菌群的益生元,也可作为食品添加剂使用,改善食品风味,提高产品质地,具有广阔的市场应用前景^[76]。

3.3 改良乳制品

在乳制品的加工过程中,由于乳糖溶解度较低,在浓缩乳制品或者冷冻乳制品时,一部分钙盐和乳糖结合导致蛋白质沉淀、乳糖结晶,使得产品口感下降^[77],故而在生产加工过程中添加 β -半乳糖苷酶水解乳糖,可以避免由乳糖引起的蛋白质聚集现象。另外,在酸乳生产加工中,因发酵周期长,李兴^[78]发现添加 β -半乳糖苷酶可使酸乳凝固时间减少15%~20%,有效缩短发酵周期,且蔗糖用量和产品口感都有所改善^[79];在乳清的加工中,因乳清含有约4%左右乳糖,添加 β -半乳糖苷酶后可产生乳清糖浆^[2],乳清糖浆甜度类似于蔗糖,但溶解度较乳糖提升了数倍,可作为蔗糖的替代品被用于乳清酒、乳清饮料的生产中^[80],极大地改善了产品的风味品质,同时拓宽乳清的使用范围。

4 结语与展望

β -半乳糖苷酶在缓解乳糖不耐受症、生产GOS和改良乳制品等领域具有重要的应用价值。可将动植物,尤其是微生物来源的 β -半乳糖苷酶基因进行修饰后转入至大肠杆菌BL21、酿酒酵母等表达宿主菌中,通过原核或真核表达系统进行异源表达,相对于传统发酵法,此方式可有效提高其产量与酶活,降低生产成本。但是目前主流的真核或原核表达系统依然存在纯化成本高、安全性偏低等问题,今后除了在现有的异源表达系统基础上开展大量、深度的研究外,还需要对兼具安全性和高分泌表达能力的表达系统进行探索;此外,如何开发新型载体和自固定化融合标签基因,以简化 β -半乳糖苷酶固定化的生产工艺并提高产品质量,也应是相关科研人员努力探索的方向之一。加大对 β -半乳糖苷酶的异源表达系统的研究力度,不仅对传统食品科学工程领域的发展具有重要意义,更有助于拓展 β -半乳糖苷酶在医疗、基因诊断治疗和环境监测等多个领域的应用范畴。

参考文献

- [1] ZAMAN U, REHMAN K U, KHAN S U, et al. Identification, kinetics and thermodynamic analysis of novel β -galactosidase from *Convolvulus arvensis* seeds: An efficient agent for delactosed milk activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022(220): 1545-1555.
- [2] 侯瑾, 杨凯, 薛冰, 等. 乳糖酶的性质及其在低乳糖乳制品中的应用[J]. *食品安全导刊*, 2022, 15(19): 172-177. [HOU Jin, YANG Kai, XUE Bing, et al. Properties of lactase and its application in low lactose dairy products[J]. *Food Safety Guide*, 2022, 15

- (19): 172–177.]
- [3] 何云山, 吴仪, 谭周进. 猪肠道乳糖酶研究进展[J]. *现代农业科技*, 2020, 48(9): 208–214. [HE Yunshan, WU Yi, TAN Zhoujin. Research progress of intestinal lactase in pigs[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2020, 48(9): 208–214.]
- [4] SONI N K, TRIVEDI H H, KUMAR S, et al. A review of digestive enzyme and probiotic supplementation for functional gastrointestinal disorders[J]. *Nutrients*, 2020, 73(3): 35–37.
- [5] BAN Q, YE H, HE Y, et al. Functional characterization of persimmon β -galactosidase gene DkGAL1 in tomato reveals cell wall modification related to fruit ripening and radicle elongation[J]. *Plant Science*, 2018, 274: 109–120.
- [6] ZHAN B A, D W A, YLA C, et al. Analysis of populus glycosyl hydrolase family I members and their potential role in the ABA treatment and drought stress response[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 163: 178–188.
- [7] MARÍA, MONEO-SÁNCHEZ, ALEJANDRO, et al. β -(1, 4)-Galactan remodelling in Arabidopsis cell walls affects the xyloglucan structure during elongation[J]. *Planta*, 2018, 249(2): 33–34.
- [8] HUIJUAN Y, JUNLING L, MEILE D, et al. Analysis of β -galactosidase during fruit development and ripening in two different texture types of apple cultivars[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9(5): 539–552.
- [9] 艾尔·毛利, 亚伦·盖伦提, 克里斯蒂娜·皮诺奇, 等. 增加从咖啡豆中提取固体的可提取性的组成物及方法: 中国, 111164216A[P]. 2020-05-15. [AL M, AARON G, CHRISTINA P, et al. A component and a method for increasing the extractability of solids from coffee beans: China, 111164216A[P]. 2020-05-15.]
- [10] SINGH R V, SAMBYAL K. β -Galactosidase as an industrial enzyme: Production and potential[J]. *Chemical Papers*, 2022, 77(1): 1–31.
- [11] GAMIZ-ARCO G, RISSO V A, GAUCHER E A, et al. Combining ancestral reconstruction with folding-landscape simulations to engineer heterologous protein expression[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(24): 167321.
- [12] KAIRAMKONDA M, SHARMA M, GUPTA P, et al. Overexpression of bacteriophage T4 and T7 endolysins differentially regulate the metabolic fingerprint of host *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 221: 212–223.
- [13] 贺璐, 龙承星, 刘又嘉, 等. 微生物乳糖酶研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(6): 268–273. [HE Lu, LONG Chengxing, LIU Youjia, et al. Research progress on microorganism lactase[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2017, 43(6): 268–273.]
- [14] 岳寿松, 边斐, 张燕, 等. 马克斯克鲁维酵母菌的分离鉴定与所产乳糖酶酶学性能研究[J]. *山东农业科学*, 2018, 50(11): 66–70. [YUE Shusong, BIAN Fei, ZHANG Yan, et al. Isolation and identification of *Kluyveromyces marxianus* strain and properties of its product of β -galactosidase[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2018, 50(11): 66–70.]
- [15] 蔡可. 黑曲霉 β -半乳糖苷酶 AghA 的分子克隆与特征解析[D]. 天津: 天津科技大学, 2019. [CAI Ke. Molecular cloning and biochemical characterization of β -galactanase AghA from *Aspergillus niger*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.]
- [16] 关波, 胡有贞, 韩明明. 产转糖基活性 β -半乳糖苷酶的开菲尔乳杆菌及制备的 β -半乳糖苷酶生产低聚半乳糖的方法: 中国, 202011173142. X[P]. 2020-10-28. [GUANG Bo, HU Youzhen, HAN Mingming. *Lactobacillus kefir* producing glycosyl-active β -galactosidase and the preparation of β -galactosidase for the production of oligo-galactose: China, 202011173142. X[P]. 2020-10-28.]
- [17] 何乃莹, 竺胜权, 黄金. 生物催化法制备低聚半乳糖的研究进展[J]. *发酵科技通讯*, 2021, 50(1): 20–27. [HE Naiying, ZHU Shengquan, HUANG Jin. Recent research progress on biocatalytic production of galactooligosaccharides[J]. *Fermentation Science and Technology Bulletin*, 2021, 50(1): 20–27.]
- [18] 高秀容. 乳糖酶的基因克隆[D]. 成都: 西华大学, 2006. [GAO Xiurong. Gene cloning of lactase[D]. Chengdu: Xihua University, 2006.]
- [19] 董艺凝, 陈海琴, 张灏, 等. β -半乳糖苷酶的研究现状与进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(4): 337–343. [DONG Yining, CHEN Haiqin, ZHANG Hao, et al. Research status and progress on β -galactosidase[J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2018, 37(4): 337–343.]
- [20] 尉淑君. β -D-半乳糖苷酶的发酵生产、分离纯化和性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011. [JU Shujun. Study on fermentation, separation, and characteristics of β -D-galactosidase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011.]
- [21] 成静, 朱智睿, 杨江科. 乳酸克鲁维酵母乳糖酶的可溶性表达及优化[J]. *生物技术*, 2020, 30(1): 17–24. [CHENG Jing, ZHU Zhirui, YANG Jiangke. Soluble expression and optimization of lactase from *Kluyveromyces lactis*[J]. *Biotechnology*, 2020, 30(1): 17–24.]
- [22] 谭树华, MAJID H A A, 高向东, 等. 脆壁克鲁维酵母乳糖酶提取物性质研究[J]. *药物生物技术*, 2000, 7(3): 153–156. [TAN Shuhua, MAJID H A A, GAO Xiangdong, et al. Properties of an inducible lactase isolated from the yeast *Kluyveromyces fragilis*[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2000, 7(3): 153–156.]
- [23] 牛丹丹, 贾超, 田晓靓, 等. 黑曲霉 F0215 中 β -半乳糖苷酶系的生化特征[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(11): 198–207. [NIU Dandan, JIA Chao, TIAN Xiaoliang, et al. Biochemical characterization of β -galactosidases from *Aspergillus niger* strain F0215[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(11): 198–207.]
- [24] 高鑫. 米曲霉来源 β -半乳糖苷酶的分子改造及其制备低聚半乳糖的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [GAO Xin. Molecular modification of the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* and the study of its ability to prepare galactooligosaccharide[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]
- [25] 徐晓锋. 黄瓜 α -半乳糖苷酶基因克隆及表达分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2006. [XU Xiaofeng. Cloning and expression analysis of α -galactosidases in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2006.]
- [26] 陈国梁, 何晓利, 王旭东, 等. 狗头枣 β -半乳糖苷酶酶学特性研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2018(10): 31–34. [CHEN Guoliang, HE Xiaoli, WANG Xudong, et al. Enzymatic characteristics of β -galactosidase from *Zizyphus jujube* Goutouzao[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2018(10): 31–34.]
- [27] THOMA J, STENITZER D, GRABHERR R, et al. Identification, characterization, and expression of a β -galactosidase from arion species (mollusca)[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1578.
- [28] 邓智年, 魏源文, 潘有强, 等. DNA 分子进化研究进展[J]. *广西农业科学*, 2009, 40(2): 128–132. [DENG Zhinian, WEI Yuanwen, PAN Youqiang, et al. Advances in DNA molecular evolution[J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2009, 40(2): 128–132.]
- [29] 彭惠, 孔慧慧, 李艺冰, 等. 一种人工改造的 β -半乳糖苷酶 GaLT1 及其在水解乳糖中的应用: 中国, CN114149987A[P]. 2022-03-08. [PENG Hui, KONG Huihui, LI Yibing, et al. A modified β -galactosidase GaLT1 and its application in the hydrolysis of lactose: China, CN114149987A[P]. 2022-03-08.]
- [30] 杨萍. 通过定点突变提高米曲霉乳糖酶的热稳定性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010. [YANG Ping. Improving the thermal stability of the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* by

- site-directed mutagenesis[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.]
- [31] 李晨霞, 向璇, 李敬, 等. 米曲霉 β -半乳糖苷酶的定向进化, 高效表达及应用[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(10): 49-57. [LI Chenxia, XIANG Zhixuan, LI Jing, et al. Directed evolution, high-level expression and application of the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(10): 49-57.]
- [32] 史然, 张登娅, 谷懿寰, 等. 地杆菌 α -L-岩藻糖苷酶的分子改造及其在合成2'-岩藻糖基乳糖中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 135-142. [SHI Ran, ZHANG Dengya, GU Yihuan, et al. Direct evolution of α -L-fucosidase from *Pedobacter* sp. and its application in the synthesis of 2'-fucosyllactose[J]. Food Science, 2021, 42(18): 135-142.]
- [33] 俞路, 王雅倩, 章世元. DNA 改组(DNA shuffling)及其研究进展[J]. 生物学杂志, 2008, 25(1): 12-16. [YU Lu, WANG Yaqian, ZHANG Shiyuan. DNA shuffling and its research progress[J]. Chinese Journal of Biology, 2008, 25(1): 12-16.]
- [34] 王珏, 吴娜, 张育敏, 等. 易错 PCR 定向进化技术提高蒙古黄芪病程相关蛋白 AmPR-10 核酸酶活性的研究[J]. 化学与生物工程, 2022, 39(2): 23-27. [WANG Jue, WU Na, ZHANG Yumin, et al. Improvement in nuclease activity of *Astragalus membranaceus* pathogenesis-related protein-10(AmPR-10) by error prone PCR directed evolution[J]. Chemical & Biological Engineering, 2022, 39(2): 23-27.]
- [35] 韩媛媛. *Lactobacillus brevis* ATCC 367 源 β -半乳糖苷酶的异源表达、酶学性质及应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020. [HAN Yuanyuan. Heterologous expression, characterization and application of the β -galactosidase from *Lactobacillus brevis* ATCC 367[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.]
- [36] HILDEGARD W, JOSEF A. Multiple integration of the gene ganA into the *Bacillus subtilis* chromosome for enhanced β -galactosidase production using the CRISPR/Cas9 system[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 158-169.
- [37] 苏松坤, 晏励民, 刘芳. 乳酸菌食品级表达系统的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(12): 1233-1238. [SU Songkun, YAN Limin, LIU Fang. Research development of LAB food-grade expression system[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(12): 1233-1238.]
- [38] YOUNG R, BUDGE J D, SMALES M C. Mammalian expression system, Europe: EP3341484[P]. 2020-09-23.
- [39] GAO J, JIANG L, LIAN J. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(2): 110-119.
- [40] 李航, 戚睿斌, 陈宗艳, 等. 外源蛋白表达系统及其应用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(7): 34-37. [LI Hang, QI Ruibin, CHEN Zongyan, et al. Progress in research on foreign protein expression system and its application[J]. Heilongjiang Animal and Veterinary Science, 2021(7): 34-47.]
- [41] 聂春明. 乳酸杆菌 β -半乳糖苷酶重叠基因的克隆、表达及酶学性质分析[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2012. [NIE Chunming. The overlapping gene cloning, expression and characterization of a β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*[D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2012.]
- [42] 窦媛媛, 林艳, 高向征, 等. 重组人bFGF的原核表达及功能分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(7): 1365-1370. [DOU Yuanyuan, LIN Yan, GAO Xiangzheng, et al. Prokaryotic expression and functional analysis of recombinant human bFGF[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2019, 41(7): 1365-1370.]
- [43] 冀成法, 刘忠, 马鲁南, 等. 重组大肠杆菌高密度、高表达研究进展[J]. 生物技术, 2022, 32(2): 246-251. [JI Chengfa, LIU Zhong, MA Lunan, et al. Review of high density fermentation and high expression of engineering *E. coli*[J]. Biotechnology, 2022, 32(2): 246-251.]
- [44] 陈卫, 张灏, 葛佳佳, 等. 高温乳糖酶基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 生物技术, 2002, 12(5): 8-11. [CHEN Wei, ZHANG Hao, GE Jiajia, et al. High-level expression of thermostable galactosidase gene in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology, 2002, 12(5): 8-11.]
- [45] 徐顺清, 陈杏洲, 崔罗生, 等. 乳酸克鲁维酵母乳糖酶基因在大肠杆菌中的表达及酶学性质[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(2): 175-180. [XU Shunqing, CHEN Xingzhou, CUI Luosheng, et al. Expression and enzymatic properties of lactase gene from *Kluyveromyces lactis* in *Escherichia coli*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(2): 175-180.]
- [46] 梁琰, 崔欣, 王哲, 等. 乳酸菌食品级表达载体的研究与应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 906-915. [LIANG Yan, CUI Xin, WANG Zhe, et al. Research and application of food-grade expression vectors of lactic acid bacteria[J]. Chinese Journal of Microbiology, 2021, 48(3): 906-915.]
- [47] 孙芝兰, 孔文涛, 孔健. *Paenibacillus* sp. K1 乳糖酶基因 bga 在乳酸乳球菌中的表达[J]. 山东大学学报(理学版), 2008, 43(7): 74-77. [SUN Zhilan, KONG Wentao, KONG Jian. Expression of lactase gene bga from *Paenibacillus* sp. K1 in *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Shandong University (Natural Science), 2008, 43(7): 74-77.]
- [48] 马雁. 自诱导型启动子 PsrfA 在大肠杆菌及乳酸菌中表达适应性的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2020. [MA Yan. Study on the expression feasibility of self-inducible promoter PsrfA in *Escherichia coli* and lactic acid bacteria[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2020.]
- [49] 王杰, 王晨, 杜燕, 等. 枯草芽孢杆菌表达和分泌异源蛋白的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2815-2826. [WANG Jie, WANG Chen, DU Yan, et al. Advances in heterologous protein expression and secretion of *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology China, 2021, 48(8): 2815-2826.]
- [50] 许俊勇, 毕然, 夏伟, 等. *Bacillus circulans* 来源 β -半乳糖苷酶在 *Bacillus subtilis* 中的表达, 性质及发酵优化[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 20-27. [XU Junyong, BI Xia, XIA Wei, et al. Heterologous expression, properties, applications, and fermentation optimization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* in *Bacillus subtilis*[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(18): 20-27.]
- [51] 王斌. 固定化 β -半乳糖苷酶的酶学性质研究[J]. 阴山学刊(自然科学版), 2018, 32(2): 46-48. [WANG Bin. Characterization of β -galactosidase immobilized on chitosan calcium alginate[J]. Yinshan Academic Journal (Natural Science), 2018, 32(2): 46-48.]
- [52] TIZCHANG S, KHIABANI M S, MOKARRAM R R, et al. Immobilization of β -galactosidase by halloysite-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix[J]. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 2021(6): 1865-1875.
- [53] 王晓静. 自固定化乳糖酶的基因构建、表达及其酶学性质研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2021. [WANG Xiaojing. Study of gene construction and expression of self-immobilized lactase and its enzymatic properties[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021.]
- [54] 李云亮. 金枪鱼降血压肽的基因设计、克隆表达和活性评价[D]. 镇江: 江苏大学, 2015. [LI Yunliang. The gene design, cloning-expression and activity evaluation of tuna antihypertensive peptide[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2015.]
- [55] 朱明慧, 李晓静, 王浩民, 等. 原核和真核双表达载体的构建

- 及功能分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(3): 437-442. [ZHU Minghui, LI Xiaojing, WANG Haomin, et al. Construction and functional analysis of prokaryotic and eukaryotic dual expression vectors[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2022, 44(3): 437-442.]
- [56] 李洪波, 罗海燕, 张树琴, 等. 重组嗜热乳糖酶在毕赤酵母中的表达、纯化与活性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(8): 812-816. [LI Hongbo, LUO Haiyan, ZHANG Shuqin, et al. Expression, purification and activity assay of recombinant thermophile lactase from *Pichia pastoris*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(8): 812-816.]
- [57] 王敏, 席志文, 黄琳娜, 等. 米曲霉乳糖酶基因在乳酸克鲁维酵母中的表达[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(7): 177-183. [WANG Min, XI Zhiwen, HUANG Linna, et al. Recombinant expression of lactase gene from *Aspergillus oryzae* in *Kluyvermyces lactis*[J]. Food Research and Development, 2019, 40(7): 177-183.]
- [58] 食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂[S]. 国内-国家标准-国家市场监督管理总局 GB 1886.174, 2016. [National standard for food safety-Food additives: Enzyme preparations for food industry[S]. Domestic-National Standards-State Administration for Market Supervision and Administration, GB 1886.174, 2016.]
- [59] 关昕. 乳糖: 让牛奶成为审稀毒药的元凶[J]. 中国食品工业, 2021(11): 105. [GUAN Xin. Lactose: Makes milk a watery poison[J]. Chinese Food Industry, 2021(11): 105.]
- [60] ELISABETH H J, ROMAN K, PATRICK W, et al. Determination of lactose in lactose-free and low-lactose milk, milk products, and products containing dairy ingredients by the lactosensr amperometry method; First action 2020.01.[J]. Journal of AOAC International, 2020, 103(6): 1534-1546.
- [61] 刘杰, 李顺发, 沈政元, 等. 低乳糖益生菌乳粉制备研究[J]. 食品与发酵科技, 2022, 58(1): 107-114. [LIU Jie, LI Shunfa, SHEN Zhengyuan, et al. Preparation technology of low lactose probiotic milk powder[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2022, 58(1): 107-114.]
- [62] LIU Y, WU Z, ZENG X, et al. A novel cold-adapted phospho-beta-galactosidase from *Bacillus velezensis* and its potential application for lactose hydrolysis in milk[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 166(4): 760-770.
- [63] 姜钊, 张卫花, 孙芳云. 双歧杆菌及寡糖类双歧因子的种类及应用[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(8): 240-248. [JIANG Zhao, ZHANG Weihua, SUN Fangyun. The types and applications of *Bifidobacterium* and bifidus factors[J]. China Food Additives, 2022, 33(8): 240-248.]
- [64] 薛雅莺, 袁卫涛, 杨海军. 低聚半乳糖的特性及应用前景[J]. 发酵科技通讯, 2011, 40(3): 50-52. [XUE Yaying, YUAN Weitao, YANG Haijun. Characteristics and application prospect of galactose oligosaccharide[J]. Fermentation Science and Technology Bulletin, 2011, 40(3): 50-52.]
- [65] 辛跃强. 低聚半乳糖对肠道益生菌作用机理的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2015. [XIN Yueqiang. Research on the mechanism of GOS applied to intestinal probiotics[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2015.]
- [66] YAO S, ZHAO Z, WANG W, et al. *Bifidobacterium longum*: Protection against inflammatory bowel disease[J]. Journal of Immunology Research, 2021, 11: 1-11.
- [67] CUKROWSKA B, BIERLA J B, ZAKRZEWSKA M, et al. The relationship between the infant gut microbiota and allergy. The role of *Bifidobacterium breve* and prebiotic oligosaccharides in the activation of anti-allergic mechanisms in early life[J]. Nutrients, 2020, 12(4): 946-962.
- [68] LAI H H, CHIU C H, KONG M S, et al. Probiotic *Lactobacillus casei*: Effective for managing childhood diarrhea by altering gut microbiota and attenuating fecal inflammatory markers[J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1150-1165.
- [69] GAO H, LI X, CHEN X, et al. The functional roles of *Lactobacillus acidophilus* in different physiological and pathological processes[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 32(10): 1226-1233.
- [70] IYER N, WILLIAMS M A, O'CALLAGHAN A A, et al. *Lactobacillus salivarius* UCC118™ dampens inflammation and promotes microbiota recovery to provide therapeutic benefit in a dss-induced colitis model[J]. Microorganisms, 2022, 10(7): 1383.
- [71] FÜREDER V, RODRIGUEZ-COLINAS B, CERVANTES F V, et al. Selective synthesis of galactooligosaccharides containing β (1 \rightarrow 3) linkages with β -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* (Saphera)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(17): 4930-4938.
- [72] WILSON B, ROSSI M, KANNO T, et al. β -Galactooligosaccharide in conjunction with low FODMAP diet improves irritable bowel syndrome symptoms but reduces fecal *Bifidobacteria*[J]. Official Journal of the American College of Gastroenterology, 2020, 115(6): 906-915.
- [73] YANG C, PUTTEN J, GILBERT M S, et al. Galacto-oligosaccharides as an anti-bacterial and anti-invasive agent in lung infections[J]. Biomaterials, 2022, 283(3): 121461.
- [74] 潘玉宁, 刘成志, 颜春荣, 等. 低聚半乳糖的生理功能研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(10): 2849-2855. [PAN Yuning, LIU Chengzhi, YAN Chunrong, et al. Research progress of physiological function of galacto-oligosaccharides[J]. 2019, 10(10): 2849-2855.]
- [75] 吴昊. 酶法制备 GOS 工艺优化及 GOS-抹茶复合产品的开发[D]. 天津: 天津大学, 2021. [WU Hao. Optimization of GOS production process by β -galactosidase and its application for the preparation of GOS-Matcha complex[D]. Tianjin: Tianjin University, 2021.]
- [76] ESKANDARLOO H, ABBASPOURRAD A. Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized on functionalized glass bead[J]. Food Chemistry, 2018, 251(15): 115-124.
- [77] 丁春明. 高产乳糖酶酵母菌的筛选、培养基优化及生长模型的研究[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2007. [DING Chunming. Study on screening, medium optimization and kinetic models of high β -glycosidase-yielding yeasts[D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia University, 2007.]
- [78] 李兴. 酶法降解乳糖及低乳糖发酵酸乳的发酵工艺技术研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2013. [LI Xing. Enzymatic degradation of lactose and technology research of low lactose fermentation yogurt[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science & Technology, 2013.]
- [79] 张海斌. 乳糖水解技术在酸奶中的研究与应用[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2017. [ZHANG Haibing. Research and application of lactose hydrolysis technology in yogurt[M]. Beijing: Science and Technology of China Press, 2017.]
- [80] 李冠龙, 刘晓兰, PRITI K. β -半乳糖苷酶的固定化及其在制备低乳糖牛奶中的应用[J]. 食品工业, 2018, 39(9): 105-110. [LI Guanlong, LIU Xiaolan, KATROLIA Priti. Immobilization of β -galactosidase and its use in preparing low lactose milk[J]. The Food Industry, 2018, 39(9): 105-110.]