

高聚合度异麦芽寡糖的制备及体外益生功能评价

许滢^{1,2}, 王蕾^{1,2}, 魏贝贝^{1,2}, 宿玲恰^{1,2}, 陈晟^{1,2}, 吴敬^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 异麦芽寡糖(isomaltooligosaccharides, IMO)是葡萄糖以 α -1,6糖苷键为主连接而成的低聚糖,具有低血糖指数特征和益生菌增殖功能。目前商业化IMO主流制备工艺得率较低,且含大量异麦芽糖,而IMO的益生功能主要归功于三糖及以上的高聚合度组分。利用黑曲霉(*Aspergillus niger*)来源的 α -葡萄糖苷酶和嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus* NO2)来源的环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)进行复配制备IMO,以获得得率和聚合度提升的IMO(命名为IMO^H)。通过单因素实验,考察了反应pH、温度、时间、底物种类及加酶(α -葡萄糖苷酶)量对产物得率的影响,随后探究了复配酶(CGTase)加酶量及反应时间的影响,结果表明在pH 5.5、50℃的反应条件下,以300 g/L的DE值为15~20的麦芽糊精为底物,当 α -葡萄糖苷酶加酶量为5 U/g(以底物质量计)、CGTase加酶量为15 U/g(以底物质量计)时,IMO^H产物得率达到64.27%,其中三糖及以上的高聚合度产物质量分数为71.57%。在对产物进行结构分析后发现,产物 α -1,6糖苷键键型占比为70.67%,平均相对分子质量为706,高于市售IMO50。通过肠道微生物体外发酵实验,IMO^H与市售IMO50相较,对青春双歧杆菌更具有增殖效果,同时可以进一步抑制肠道条件致病菌大肠杆菌的生长,具有一定的体外益生功能。该研究提出了一种双酶复配制备IMO的新工艺,为工业制备高得率、高聚合度的IMO提供了新思路。

关键词: 异麦芽寡糖; α -葡萄糖苷酶;环糊精葡萄糖基转移酶;制备工艺;益生功能

中图分类号:Q 555;Q 556 文章编号:1673-1689(2023)01-0066-09 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2023.01.005

Synthesis of Isomaltooligosaccharides with High Degree of Polymerization and Its *in vitro* Probiotic Function Evaluation

XU Ying^{1,2}, WANG Lei^{1,2}, WEI Beibei^{1,2}, SU Lingqia^{1,2}, CHEN Sheng^{1,2}, WU Jing^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Isomaltooligosaccharides (IMO) are oligosaccharides mainly composed of α -1,6 glycosidic bonds linked glucoses, which have physiological characteristics of hypoglycemic index and promoting probiotics proliferation. The current commercial IMO production has low yield and high isomaltose content in the product, while the probiotic function of IMO is mainly attributed to the high polymerization fractions like disaccharides and above. In this study, α -glucosidase from

收稿日期: 2022-01-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32001637);国家自然科学基金重点项目(31730067);国家自然科学基金面上项目(31972032)。

*通信作者: 吴敬(1969—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶工程与发酵工程研究。E-mail:jingwu@jiangnan.edu.cn

Aspergillus niger and cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) from *Bacillus stearothermophilus* NO2 were combined for synthesis of IMO with improved yield and polymerization (named IMO^H). In this study, the effects of reaction pH, temperature, time, substrate type and enzyme addition on the yield were investigated by single-factor experiments, and the effects of compound enzyme amount and reaction time were subsequently explored. The results showed that the yield of IMO^H reached 64.27%, and the high polymerization content of trisaccharides and above was 71.57% under pH 5.5 at 50 °C, using 300 g/L maltodextrin with DE values ranges from 15 to 20 as the substrate, and with α -glucosidase of 5 U/g substrate (calculated by substrate mass) and CGTase of 15 U/g substrate (calculated by substrate mass). The structural analysis of IMO^H products showed that the ratio of α -1,6 bond ratio was 70.67%, and the average molecular weight of products was 706, which was higher than that of commercial IMO50. The *in vitro* fermentation experiments of intestinal microorganisms suggested that compared with commercial IMO50, the IMO^H had a better proliferative effect on *Bifidobacterium adolescentis*, and could further inhibit the growth of opportunistic bacteria *Escherichia coli* in intestinal tract, showing a certain *in vitro* probiotic effect. This study proposed a new process of the IMO synthesis by the dual-enzyme compounds, providing a new idea for the industrial synthesis of IMO with high yield and high degree of polymerization.

Keywords: isomaltooligosaccharides, α -glucosidase, cyclodextrin glucosyltransferase, preparation process, probiotic function

异麦芽寡糖 (isomaltooligosaccharides, IMO) 是葡萄糖以 α -1,6 糖苷键为主连接而成的低聚糖混合物,主要成分为异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖及四糖以上的低聚糖。IMO 甜度柔和,耐热耐酸,升糖指数低,是一种良好的低热量甜味剂,同时具有降低血清胆固醇含量、改善肠道微生物环境等益生效益^[1]。由于其优良的理化性质及生理功能,IMO 被广泛应用于功能性食品及医药保健品行业中,拥有巨大的市场需求量。

天然 IMO 主要存在于味噌、黄酒等发酵食品中,并以游离状态微量存在于红薯、木薯等淀粉作物中。由于天然提取成本高且工艺复杂,目前市售 IMO 主要依靠酶法生产,聚合度 (degree of polymerization, DP) 大概在 2~6。主流的工业制备 IMO 方法是以淀粉质原料为底物,依靠 α -淀粉酶及 β -淀粉酶等将淀粉液化、糖化,生成以麦芽糖为主的低聚合度寡糖混合物,再结合 α -葡萄糖苷酶的转苷作用生成具有 α -1,6 糖苷键的复杂寡糖混合物^[2],该方法制备 IMO 得率(IMO 产物质量与底物质量的比)一般在 50%~55%,即为市售的 IMO50,其主要成分为异麦芽糖、异麦芽三糖和潘糖。然而,研究表明,IMO 的益生功能主要归功于三糖及以上的高聚

合度组分^[3-4]。另一种生产方式是以蔗糖为底物原料,使用葡聚糖蔗糖酶(dextranase, DS)合成右旋糖酐,再通过右旋糖酐酶(dextranase, DN)作用水解生产 IMO^[5],这种生产方法可通过调控底物浓度及 DS、DN 使用比例来调整产物聚合度,但由于生产原料蔗糖成本较高,且该方法只能利用蔗糖中的葡萄糖单元,理论得率不超过 50%,不适用于工业化生产。易子玲等通过将 4,6- α -葡萄糖基转移酶和普鲁兰酶、异普鲁兰酶、异麦芽三糖右旋糖酐酶复配,以淀粉为底物可制备高纯度异麦芽三糖,产物得率为 65.3%^[6],为以淀粉为底物制备高聚合度 IMO 提供了新思路,但是该法存在使用复配酶种类多、工艺复杂等问题。因此,如何在低原料成本的基础上,开发简易新工艺,提升产品得率及聚合度是高效制备 IMO 主要攻克的难题。

α -葡萄糖苷酶依靠转移单个葡萄糖基生成 IMO,其反应机理决定了产物主要集中为二糖、三糖等低 DP 组分。在催化转苷反应的同时, α -葡萄糖苷酶还会进行水解反应,形成大量葡萄糖,不利于高 DP 组分的生成及稳定^[7-8]。环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)属于糖基水解酶 13 家族及 α -淀粉酶家族,可发生 3 种转苷反应(歧化反应、环化反应、偶

联反应)及一种水解反应,其中歧化反应为分子间转苷反应。不同于 α -葡萄糖苷酶,CGTase能以直链麦芽低聚糖为供体^[9],将葡萄糖、麦芽糖等小分子糖作为受体^[10],催化分子间转苷反应,具有提高受体稳定性、改善理化性质等作用^[11]。当其以直链多糖为供体和葡萄糖、麦芽糖等为受体时,可以生产得到线性寡糖混合物,进而提高淀粉制糖体系底物利用率^[12]。针对工业生产IMO的问题,在以往制备IMO主要用酶(α -葡萄糖苷酶)的基础上,复配使用了CGTase,提出一种以麦芽糊精为底物,通过使用黑曲霉(*Aspergillus niger*)来源的 α -葡萄糖苷酶复配嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus* NO2)来源的CGTase制备IMO的新方法,将这种双酶复配法制备的聚合度提高的IMO命名为IMO^H。通过单因素实验结合双酶复配对酶转化条件进行了优化,包括pH、温度、反应时间、加酶量、底物种类、复配酶加酶量及复配酶反应时间等,在最优条件下制备得到反应液后,将产品经活性干酵母消化并冷冻干燥处理,对产物结构如相对分子质量、链长分布、键型比例进行测定分析,同时通过体外肠道微生物的发酵对产品的益生效果进行评价。与市售IMO50比较,双酶复配制备的IMO^H中 α -1,6糖苷键键型占比更高,平均相对分子质量更大,益生效果更好。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒 毕赤酵母(*Pichia pastoris*) KM71、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、具有*A. niger*来源的 α -葡萄糖苷酶基因的质粒pPIC9K^[13]、具有*B. stearothermophilus* NO2来源的环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)基因的质粒pET-24a(+)^[14]均保藏于作者所在实验室。

1.1.2 材料与试剂 麦芽糊精:菏泽天邦生物制品有限公司产品;商业化异麦芽寡糖IMO50:山东百龙生物有限公司产品;高温 α -淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶、普鲁兰酶:山东隆大生物工程有限公司产品;酵母粉、胰蛋白胨:英国Oxoid公司产品;牛肉浸粉:美国Neogen公司产品;异麦芽糖、潘糖、异麦芽三

糖标准品:日本Glycarbo公司产品;其他试剂(均为国产分析纯):上海国药集团产品。

1.1.3 仪器与设备 Agilent 1260 Infinity II液相色谱系统、Hi-Plex Ca(7.7 mm×300 mm)色谱柱:安捷伦科技有限公司产品;高效凝胶排阻色谱仪:美国怀雅特技术公司产品;HYPERSIL APS2(250 mm×4.6 mm,5 μ m)色谱柱、离子色谱仪:美国赛默飞公司产品;全数字化核磁共振波谱仪:德国布鲁克公司产品;厌氧工作站:英国依莱泰科公司产品。

1.1.4 培养基 肠道微生物基础培养基(g/L):蛋白胨 2.0, 酵母粉 2.0, NaCl 0.1, K₂HPO₄ 0.04, KH₂PO₄ 0.04, CaCl₂·2H₂O 0.01, MgSO₄·7H₂O 0.01, NaHCO₃ 0.5, 半胱氨酸盐酸盐 0.5, 胆盐 0.5, 吐温 80 2.0。MRS培养基(g/L):蛋白胨 10.0, 酵母粉 50, 牛肉浸粉 10.0, 葡萄糖 20.0, 柠檬酸氢二铵 2.0, 乙酸钠 5.0, K₂HPO₄ 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, MnSO₄·H₂O 0.05, 吐温 80 1.0。其余培养基为培养大肠杆菌及毕赤酵母常用培养基:LB、TB、YPD、BMGY、BMMY等培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 α -葡萄糖苷酶及CGTase酶液的制备 以*P. pastoris* KM71为宿主,对 α -葡萄糖苷酶基因进行表达;以*E. coli* BL21(DE3)为宿主,对CGTase基因进行表达。使用大肠杆菌^[14]及毕赤酵母^[13]常用培养方法培养对应重组菌株,发酵结束后于8 000 r/min下离心20 min收集上清液,即得到对应粗酶液。

1.2.2 酶活力测定 α -葡萄糖苷酶转苷酶活力在pH 5.5的50 mmol/L乙酸-乙酸钠缓冲液中测定,缓冲液中溶有50 g/L的麦芽糖溶液。在45 $^{\circ}$ C下,以900 μ L麦芽糖溶液为底物,加入100 μ L稀释一定倍数的酶液,精确反应5 min后煮沸灭酶。体系中转苷生成的异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖含量由HPLC测定。酶活力定义:在上述条件下,将每分钟催化转苷1 μ mol葡萄糖基所需的酶量定义为一个酶活力单位。CGTase的歧化酶活力测定方法参考文献[15]中的EPS法。酶活力定义:该测定条件每分钟转化1 μ mol EPS所需的酶量定义为一个酶活力单位。

1.2.3 高聚合度异麦芽寡糖的制备 以溶于50 mmol/L乙酸-乙酸钠缓冲液的300 g/L麦芽糊精为底物,加入一定量的 α -葡萄糖苷酶酶液及CGTase酶液,在一定温度下于转速为150 r/min水浴摇床中反应一定时间,反应完成后煮沸灭酶。将反应体

系 pH 调整为 5.0,加入 100 U/g(以底物质量计)高温 α -淀粉酶、20 U/g 淀粉葡萄糖苷酶(以底物质量计)及 1 U/g(以底物质量计)普鲁兰酶消化处理未反应完全的麦芽糊精,于 60 °C、150 r/min 水浴摇床中反应 2 h 后煮沸灭酶,离心得到产物 IMO^H。

1.2.4 高聚合度异麦芽寡糖的制备工艺优化

1)时间优化 反应条件为 pH 5.5、45 °C,底物为 DE 值在 15~20 的 300 g/L 麦芽糊精, α -葡萄糖苷酶加酶量控制为 2 U/g(以底物质量计),每隔 6 h 取样,至 24 h 反应结束。

2)温度优化 控制其他条件不变,将反应温度分别设置为 40、45、50、55、60 °C,反应时间为 12 h。

3)pH 优化 控制其他条件不变,将反应 pH 分别设置为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,反应时间为 12 h。

4)底物种类优化 控制其他条件不变,将底物种类分别设置为 DE 值为 2、DE 值为 8~10、DE 值为 15~20 的麦芽糊精,反应时间为 12 h。

5)加酶量优化 控制其他条件不变,将 α -葡萄糖苷酶加酶量分别设置为 2、5、10、15、20 U/g(以底物质量计),反应时间为 12 h。

6)复配酶加酶量优化 控制其他条件不变, α -葡萄糖苷酶加酶量为 5 U/g(以底物质量计),将复配酶(CGTase)加酶量分别设置为 10、15、20、25 U/g(以底物质量计),每隔 6 h 取样至 24 h 反应结束。

1.2.5 酶转化产物的检测 将酶转化产物进行一定比例的稀释后使用 0.22 μ m 滤膜过滤,制备得到液相检测样品,使用 HPLC 检测相关产物的含量,计算得率,其中 IMO^H 包含 DP \geq 3 的高聚合度组分和异麦芽糖。测定高聚合度成分使用的 HPLC 程序及参数:Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统,RID 示差检测器,Hi-Plex Ca(7.7 mm \times 300 mm)色谱柱,柱温 80 °C,检测器温度为 40 °C,以纯水作为流动相,流量为 0.5 mL/min,通过面积归一法对产物定量。测定异麦芽糖使用的 HPLC 程序及参数:Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统,RID 示差检测器,HYPERSIL APS2(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)色谱柱,柱温及检测器温度为 35 °C,以体积分数为 75%的乙腈为流动相,流量为 0.8 mL/min,通过外标法对产物定量。

1.2.6 酶转化产物理化性质测定方法

1)酶转化产物的分离 将得到的酶转化产物离心后,加入 0.33 g/g(以底物质量计)的活性干酵

母消化^[16]去除葡萄糖,于 30 °C、200 r/min 摇床下反应 8 h 后煮沸灭菌,离心分离后得到上清液。将上清液冷冻干燥,得到产品,即为 IMO^H 粉末。

2)相对分子量测定 使用高效凝胶排阻色谱法(HPSEC)测定 IMO^H 产物的平均相对分子量,HPSEC 利用产物在流动相中的体积大小、流动速度对其进行大小测定。HPSEC 设置程序及参数:采用 ULtrahydrogel™ Linear(300 mm \times 7.8 mm)凝胶柱,柱温为 45 °C,以 0.1 mol/L NaNO₃ 为流动相,流量为 0.9 mL/min。

3)链长分布 使用高效阴离子交换色谱(HPACE-PAD)对产物成分进行分析。HPACE-PAD 利用微孔聚合阴离子交换树脂对 DP \leq 12 的糖组分进行交换层析,随后进入检测器进行分析。采用 DIONEX ICS-5000+SP-5 离子色谱仪进行检测,使用 CarboPac PA1 色谱柱(4 mm \times 250 mm),以 0.6 mol/L 乙酸钠为流动相,流量为 1.0 mL/min,使用麦芽糊精作为标准品。

4)核磁共振分析(¹H-NMR) 称取 20 mg 冷冻干燥后的产物,溶于 500 μ L 重水中,其中重水中含有用于校准化学位移的内标物 0.3 g/L 三甲基硅烷磷酸酯(TMSP)。使用全数字化核磁共振波谱仪 AVANCE III 在环境温度下以 400 MHz 对产品进行氢谱分析。通过在 δ 为 5.00 和 5.39 处的信号峰峰面积的积分来计算产品的键型比例。

1.2.7 肠道微生物的培养 将菌株于 37 °C 恒温恒湿厌氧培养箱中静置培养 24~48 h 进行活化。在活化扩大培养后,取一定量的菌液分别转接至含有 10 g/L IMO^H、市售 IMO50、未添加其他碳源(空白)的基础培养基中,使得初始 OD₆₀₀ 为 0.05,于 37 °C 恒温恒湿厌氧培养箱中静置培养。分别在 6、12、24、36、48 h 取样,测定菌液在 600 nm 处吸光度及发酵液 pH 变化,分别绘制对应曲线,比较不同碳源下不同肠道微生物的生长状态^[17-18]。

2 结果与分析

2.1 高聚合度异麦芽寡糖产物制备

2.1.1 酶转化单因素优化 为了提高 IMO 产量,对酶转化涉及参数进行了优化。首先采用单因素实验分析了反应时间、pH、温度、底物种类、加酶量对 IMO^H 制备的影响(见图 1)。初步分析得到了 IMO^H 制备最优条件为反应时间 12 h,反应温度 50 °C,反

应pH为5.5,底物选择葡萄糖含量较高的DE值为15~20的麦芽糊精, α -葡萄糖苷酶加酶量为5 U/g(以底物质量计),在此最优条件下IMO得率最高可达41.34%。

2.1.2 双酶复配优化 基于单因素研究结果,复配使用CGTase,探究了复配酶加酶量及反应时间对得率的影响。产物得率在不同复配酶加酶量下随时间

的变化结果如图2所示。在复配酶加酶量为15 U/g(以底物质量计),反应时间为18 h时,得率达到较为稳定的水平,IMO^H得率最高可达64.27%,其中三糖及以上高聚合度组分占比可达71.57%。此后再延长反应时间,得率不能得到进一步提升,同时可能因为酶的水解作用,对生成产物进行水解,从而降低制备效率。

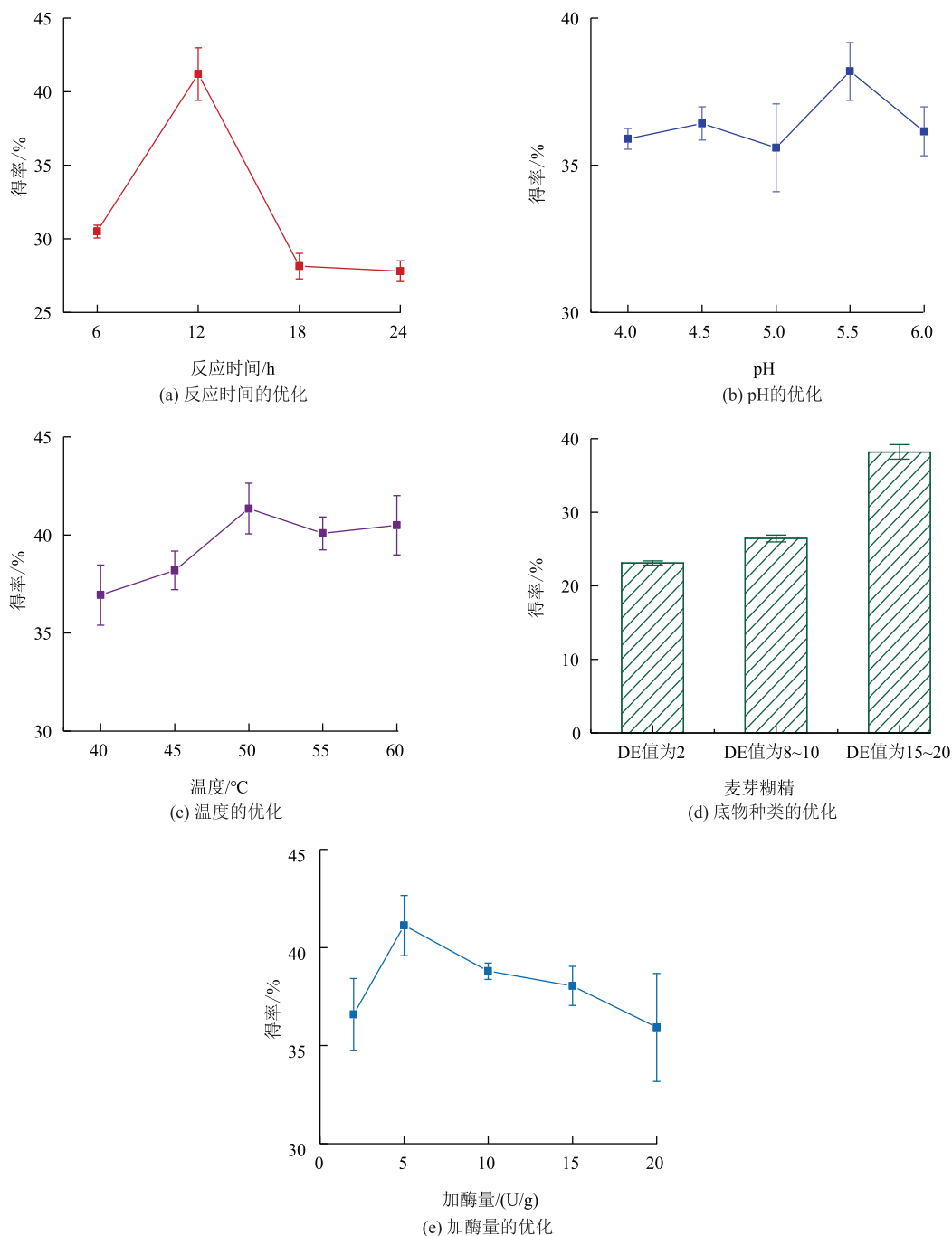


图1 α -葡萄糖苷酶制备IMO优化结果

Fig. 1 Optimization of IMO synthesis by α -glucosidase

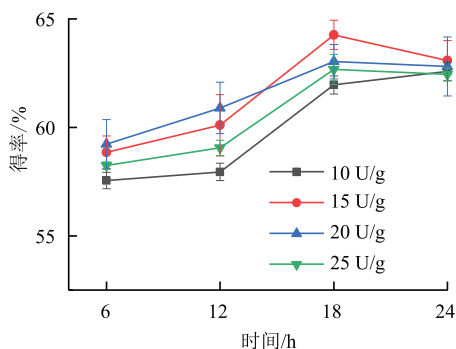


图 2 双酶复配优化结果

Fig. 2 Results of optimization by the dual-enzyme combination

对转化产物消化前葡萄糖含量和消化后高聚合度组分含量进行分析,如表 1 所示,实验结果表明,在复配 CGTase 后,产物的葡萄糖组分明显减少,IMO^H 得率得到大幅度提升,证明双酶复配法在一定程度上利用了葡萄糖并生成了更长链的糖分子。

表 1 IMO^H 组分

Table 1 Content of IMO^H

组别	消化前	消化后	
	葡萄糖质量分数/%	IMO ^H 得率(质量分数)/%	高聚合度组分占比/%
单酶制备	15.04	41.34	60.83
双酶复配	7.06	64.27	71.57

根据 α -葡萄糖苷酶和 CGTase 作用机制,作者绘制如图 3 的双酶复配原理示意图。 α -葡萄糖苷酶主要以底物中麦芽糖、麦芽三糖为主的寡糖为供体底物,通过第一步反应生成葡萄糖- α -葡萄糖苷酶复合物,第二步以水分子或葡萄糖、麦芽糖等做受体,发生水解或转苷反应^[19-20],最终分别生成葡萄糖或异麦芽糖、潘糖等 IMO 成分。 α -葡萄糖苷酶的水解活性较高,因此体系中会存在大量葡萄糖,在转苷反应中该葡萄糖同时也会与生成的异麦芽糖、潘糖等竞争,不利于三糖及以上聚合度寡糖生成。在复配使用 CGTase 后,CGTase 可直接利用反应液中的麦芽多糖作供体,以葡萄糖、麦芽糖等小分子糖为受体发生转苷反应^[10],利用体系产生的葡萄糖;同时,也会将麦芽多糖转化成聚合度降低的麦芽寡糖,为 α -葡萄糖苷酶提供转苷反应底物。这些可能是复配 CGTase 能够提高产物聚合度和得率的原因。

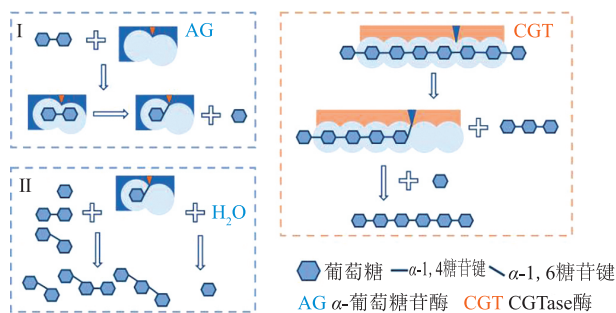


图 3 双酶复配原理示意图

Fig. 3 Schematic diagram of the principle of dual-enzyme combination

2.2 产物结构分析

IMO 的结构与性质取决于聚合度、糖苷键键型比例、葡萄糖单元连接方式等,其中聚合度越高, α -1,6 糖苷键比例越高,产物结构越复杂,IMO 越不易在消化道中被消化,益生效果更好^[21]。为确定产物结构与性质,对 IMO^H 平均相对分子质量、链长分布及键型比例进行测定。如图 4(a)所示,对产物相对分子质量进行测定,其中相对分子质量与出峰时间之间的关系由不同相对分子质量的葡聚糖标准品进行校正,IMO^H 平均相对分子质量 M_w 为 706,这说明产物的平均聚合度为 4.36,相较于市售 IMO50 的平均聚合度(3.12)更高。同时,为了确定实际产物组分,使用高效阴离子交换色谱对链长分布进行了分析,结果如图 4(b)所示,相较于市售 IMO50,IMO^H 高聚合度组分占比更高。为进一步鉴定产物键型,使用 ¹H-NMR 分析,结果如图 4(c)所示,在 $\delta=5.00$ 和 $\delta=5.39$ 处出现了分别对应于 α -1,4 糖苷键和 α -1,6 糖苷键的特征峰,按照峰面积比例计算,产物 α -1,6 糖苷键达到 70.67%,相较于市售 IMO50 的键型占比(53.27%),IMO^H 更占优势。根据测定结果,可以推测出 IMO^H 具有更优良的产品性质。

2.3 体外益生效果评价

2.3.1 生长曲线变化 目前,许多研究利用肠道微生物对产品进行体外发酵实验确定其实际益生效果。肠道益生菌如双歧杆菌可选择性利用含有 α -1,6 糖苷键的益生元进行增殖,在大量增殖后可产生局部厌氧环境,抑制好氧有害菌的生长^[17-18]。因此,通过肠道微生物的体外生长状况可推测产品的益生功能。作者将 IMO^H 及市售 IMO50 作为碳源添加到基础培养基中,以基础培养基(空白)为对照,选取成人肠道益生菌双歧杆菌中占比最高的两种

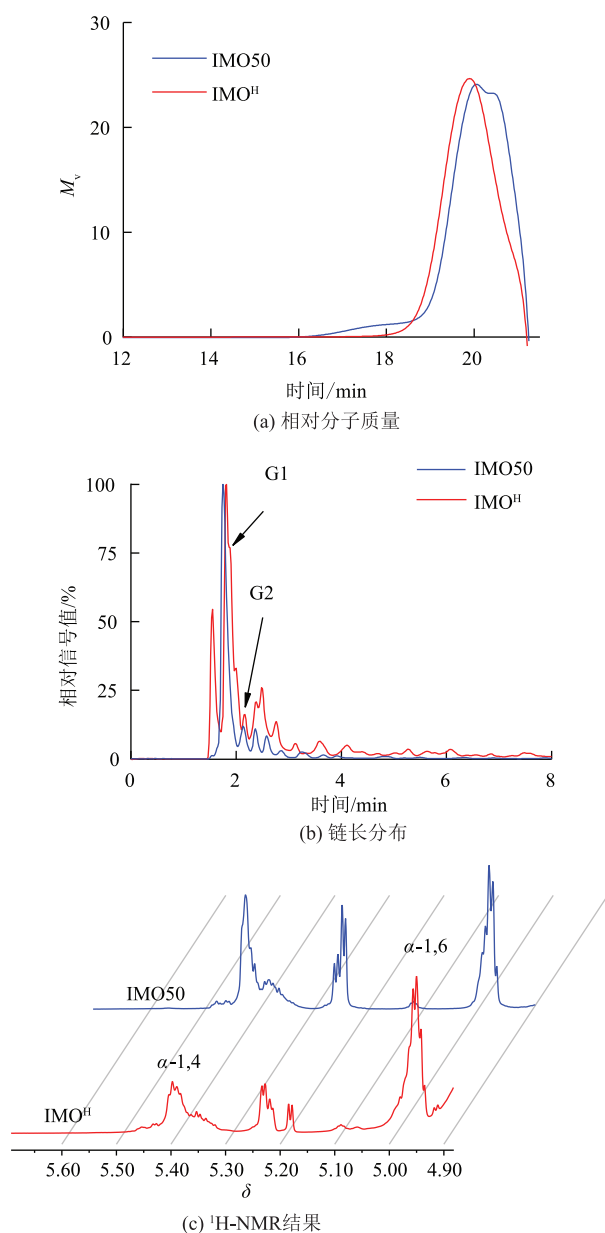


图 4 产物性质测定结果

Fig. 4 Properties detection of the production

菌种——青春双歧杆菌及长双歧杆菌^[22]和肠道条件致病菌大肠杆菌作为研究对象,考察了 IMO^{II} 对益生菌、条件致病菌生长状况的影响。图 5(a)及图 5(b)分别为青春双歧杆菌及长双歧杆菌的生长曲线, IMO^{II} 对益生菌青春双歧杆菌更具有增殖作用,对长双歧杆菌作用效果与 IMO50 相近;图 5(c)为肠道条件致病菌大肠杆菌的生长曲线, IMO^{II} 对肠道条件致病菌大肠杆菌具有抑制作用,具有一定的体外益生功能^[22-23]。

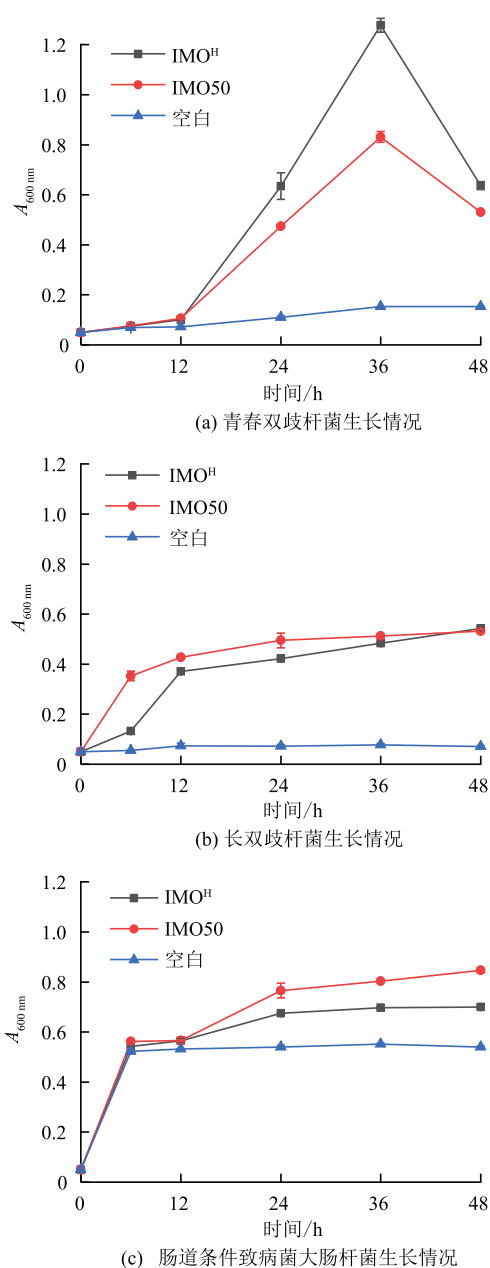


图 5 肠道微生物体外培养生长情况

Fig. 5 Growth of intestinal microorganisms cultivated *in vitro*

2.3.2 pH 变化 肠道益生菌在生长过程中会代谢如乙酸、丁酸等短链脂肪酸,这些化合物会降低肠道环境 pH,抑制肠道有害菌的生长,同时减少有害代谢物质的生成^[24]。通过 pH 变化情况,可推断肠道微生物生长环境的变化及有益代谢物质的生成。如图 6(a)及图 6(b)所示,与空白组相比,青春双歧杆菌及长双歧杆菌在含 IMO^{II} 基础培养基中培养时产生酸性物质降低环境 pH,其 pH 变化与 IMO50 中

的接近;图 6(c)为肠道条件致病菌大肠杆菌的生长曲线,大肠杆菌在含 IMO^H 基础培养基中培养时 pH

变化相较于 IMO50 中的更小。

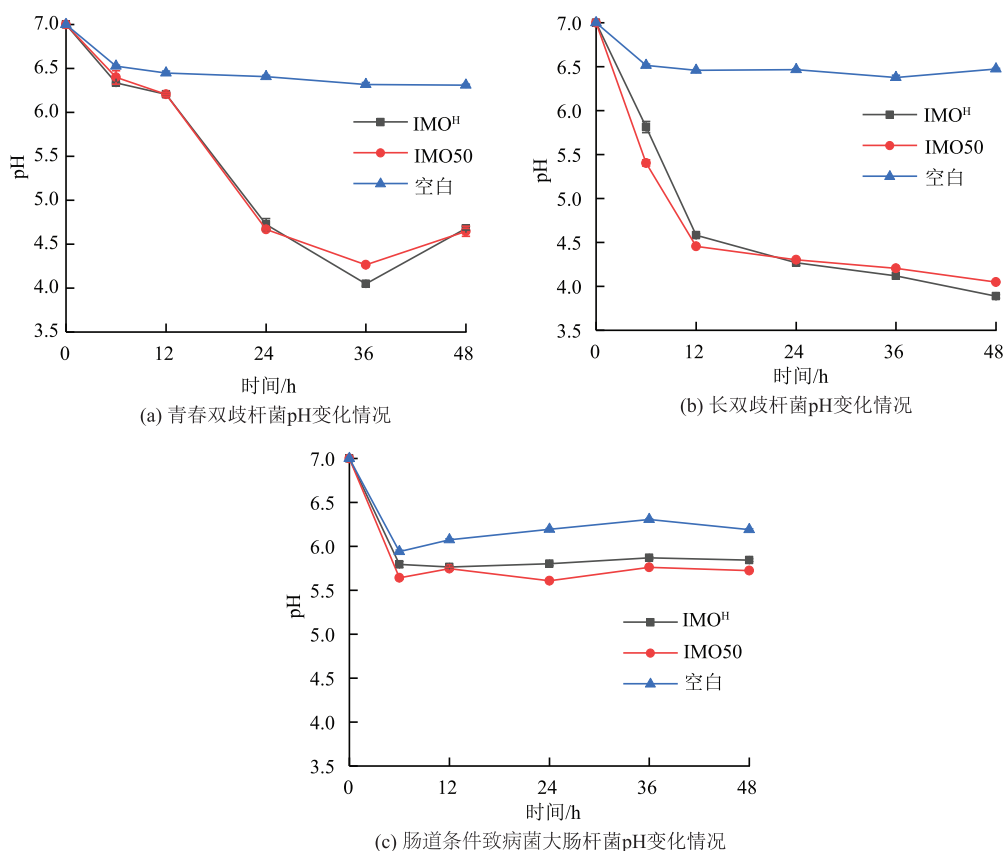


图 6 肠道微生物体外培养 pH 变化情况
Fig. 6 pH of intestinal microorganisms cultivated *in vitro*

3 结 语

作者基于 α -葡萄糖苷酶生产 IMO 的生产工艺,复配使用了 CGTase,研究了 IMO^H 的制备工艺、产物结构及体外益生功能。结果显示,在经过酶转化条件优化后,产品 IMO^H 得率达到 64.27%,其中三糖及以上高聚合度组分占比达到 71.57%。经过消化、冷冻干燥后的产物平均相对分子质量为 706, α -

1,6 糖苷键键型占比达到 70.67%,对益生菌青春双歧杆菌具有增殖效果,且对于肠道条件致病菌大肠杆菌具有抑制效果。IMO^H 相较于市售 IMO50 具有更良好的产品性质及体外益生功能。研究结果为 IMO 的工业制备提供了新思路。在后续研究中,可对 α -葡萄糖苷酶进行结构分析并改造,提高其转苷活性,或寻找其他来源的转苷活性更强的 α -葡萄糖苷酶进行研究,进一步提高 IMO 得率。

参考文献:

- [1] GOFFIN D, DELZENNE N, BLECKER C, et al. Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market: the status of knowledge on these prebiotics[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2011, 51(5): 394-409.
- [2] SORNDECH W, NAKORN K N, TONGTA S, et al. Isomalto-oligosaccharides: recent insights in production technology and their use for food and medical applications[J]. **LWT- Food Science and Technology**, 2018, 95: 135-142.

- [3] KANEKO T, KOHMOTO T, KIKUCHI H, et al. Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal bifidobacteria[J]. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1994, 58(12): 2288-2290.
- [4] PALANIAPPAN A, EMMAMBUX M. The challenges in production technology, health-associated functions, physico-chemical properties and food applications of isomaltooligosaccharides[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021, 26: 1-17.
- [5] KIM Y M, SEO M Y, KANG H K, et al. Construction of a fusion enzyme of dextransucrase and dextranase: application for one-step synthesis of isomalto-oligosaccharides[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2009, 44(3): 159-164.
- [6] 易子玲, 吴敬, 陈晟, 等. 基于右旋糖酐合成与降解的两步法制备低聚异麦芽糖[J]. **食品与发酵工业**, 2021, 47(16): 135-140.
- [7] CASA-VILLEGAS M, MARIN-NAVARRO J, POLAINA J. Synthesis of isomaltooligosaccharides by *Saccharomyces cerevisiae* cells expressing *Aspergillus niger* α -glucosidase[J]. **ACS Omega**, 2017, 2(11): 8062-8068.
- [8] CHIBA S. Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase[J]. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1997, 61(8): 1233-1239.
- [9] NAKAMURA A, HAGA K, YAMANE K. The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a Ping-Pong mechanism[J]. **FEBS Letters**, 1994, 337(1): 66-70.
- [10] SUMIO K, KOJI H, KOKI F, et al. Acceptor specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* and synthesis of α -D-glucosyl O- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucoside [J]. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1992, 56(9): 1386-1391.
- [11] DESMET T, SOETAERT W, BOJAROVÁ P, et al. Enzymatic glycosylation of small molecules: challenging substrates require tailored catalysts[J]. **Chemistry—A European Journal**, 2012, 18(35): 10786-10801.
- [12] BRUNEI C, LAMARE S, LEGOY M D. Studies of specific cyclodextrin production starting from pure maltooligosaccharides using *Thermoanaerobacter* sp. cyclodextrin glycosyltransferase[J]. **Biocatalysis and Biotransformation**, 1998, 16(4): 317-327.
- [13] LIU X, WU D, WU J, et al. Optimization of the production of *Aspergillus niger* α -glucosidase expressed in *Pichia pastoris* [J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2013, 29(3): 533-540.
- [14] TAO X M, WANG T, SU L Q, et al. Enhanced 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis through iterative saturation mutagenesis of acceptor subsite residues in *Bacillus stearothermophilus* NO2 cyclodextrin glycosyltransferase [J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2018, 66(34): 9052-9060.
- [15] VAN DER VEEN B A, LEEMHUIS H, KRALJ S, et al. Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276(48): 44557-44562.
- [16] YOON S H, MUKERJEA R, ROBYT J F. Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation[J]. **Carbohydrate Research**, 2003, 338(10): 1127-1132.
- [17] VERNAZZA C L, GIBSON G R, RASTALL R A. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2006, 100(4): 846-853.
- [18] RYCROFT C E, JONES M R, GIBSON G R, et al. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2001, 91(5): 878-887.
- [19] 任莉琼. 构巢曲霉来源 α -葡萄糖苷酶的克隆表达及其应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [20] AKIHIKO K, HIROKAZU M, AKISHIGE S, et al. Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1991, 55(9): 2327-2335.
- [21] HU Y, WINTER V, GÄNZLE M. *In vitro* digestibility of commercial and experimental isomalto-oligosaccharides [J]. **Food Research International**, 2020, 134(5): 1-8.
- [22] 黄婧, 辛修锋. 不同功能性低聚糖的益生元功效比较[J]. **中国食品添加剂**, 2009(Suppl.1): 30-33.
- [23] CRITTENDEN R, KARPPINEN S, OJANEN S, et al. *In vitro* fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2002, 82(8): 781-789.
- [24] SANCHEZ B, CHAMPOMIER-VERGES M C, COLLADO M, et al. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype longum[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73(20): 6450-6459.