



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108384821 A

(43)申请公布日 2018.08.10

(21)申请号 201711364218.5

(22)申请日 2017.12.18

(71)申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市玄武区孝陵卫
钟灵街50号

(72)发明人 张宏志 周剑忠 王英 刘小莉
夏秀东 李亚辉 魏照辉

(74)专利代理机构 北京思创大成知识产权代理
有限公司 11614

代理人 尹慧晶

(51)Int.Cl.

C12P 19/18(2006.01)

C07H 3/06(2006.01)

C07H 1/06(2006.01)

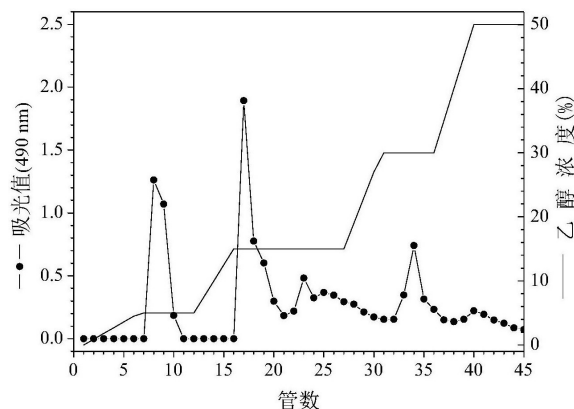
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法,该方法根据酶对不同底物的选择特异性,以乳糖和纤维二糖、蜜二糖、海藻糖等常见的低聚二糖分别作为混合底物,用来源于植物乳杆菌70810 β -半乳糖苷酶催化转糖基反应,得到的产物通过活性炭 β -硅藻土吸附层析进行分类纯化,得到各种异低聚半乳糖混合物。该制备方法工艺简单,成本低,采用该方法制备得到的低聚糖中三个分子以上低聚糖含量在95%以上,且表现出对肠道益生菌显著的增殖功能活性,同时抑制有害菌生长,产物中几乎不含单糖和双糖,扩大了受用人群和应用领域,安全性高,可直接应用于各类食品添加。



1. 一种促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法,其特征在于主要包括以下步骤:

(1) 将乳糖和双糖受体置于反应容器中,加入50mmol/L磷酸盐缓冲溶液并调整总糖浓度,再于121℃,100~105Kpa处理15-25min,使其完全溶解后自然冷却至40-44℃,水浴保温30min;

(2) 将β-半乳糖苷酶加入上述反应体系,使其浓度达到10~20U/mL后置于恒温水浴摇床中进行反应;

(3) 沸水浴灭酶5min以终止反应;

(4) 将上述反应产物,通过活性炭-硅藻土吸附层析进行分类纯化,去除单糖和双糖,纯化产物经稀释后冷冻干燥制得产品。

2. 根据权利要求1所述的促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法,其特征在于步骤(1)中乳糖和双糖受体质量比为1:2~1:4。

3. 根据权利要求1所述的促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法,其特征在于步骤(1)中磷酸盐缓冲溶液pH6.5~7.5。

4. 根据权利要求1所述的促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法,其特征在于步骤(1)中总糖浓度40~60%。

5. 根据权利要求1所述的促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法,其特征在于步骤(2)中反应温度40~44℃。

6. 根据权利要求1所述的促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法,其特征在于步骤(2)中摇床转速为150~250r/min。

7. 根据权利要求1所述的促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法,其特征在于步骤(3)中反应时间为10~14h。

一种促进肠道益生菌增殖的低聚糖的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及功能性低聚糖生产的领域,更具体地,涉及一种促进肠道 益生菌增殖的低聚糖的制备方法。

背景技术

[0002] 人和动物肠道内所栖息的多种细菌组成了肠内的细菌系统,双歧杆菌 和乳酸菌是人类肠道菌群中少数不产生内毒素和外毒素,且无致病性的有益微生物。大量实验结果表明,双歧杆菌和乳酸菌在肠道内的增殖可以提高机体抗体水平,启动巨噬细胞的吞噬活性,提高抗感染能力,是肠道内 对人体健康最有促进作用的有益菌。由于人体胃肠缺乏水解功能性低聚糖 的酶系统,功能性低聚糖能避免人体消化系统干扰,选择性进入大肠,被双歧杆菌等有益菌利用,而一些有害细菌如志贺氏杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等对大多数益生元很难加以利用,因此功能性低聚糖可以选择 性促进益生菌增殖,优化肠道菌群,改善肠道微环境。

[0003] 功能性低聚糖是一种新型的功能性食品添加剂,其中食疗效果最好 的是被称为“双歧因子”的低聚半乳糖(GOS)。GOS,通常是以乳糖(β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- α , β -D-Glcp)为单一底物,利用 β -半乳糖苷酶将其中的半乳糖基部分转移到反应混合物中的糖分子上形成复杂多样的低聚糖。混合物中的糖分子包括半乳糖、葡萄糖、乳糖以及不断合成的更高聚合度低聚糖。乳糖在反应中既是半乳糖基的供体,同时也是半乳糖基的受体,合成的低聚糖种类大约30多种,其分子通式为(Galactose) n -Galactose/Glucose。

[0004] 鉴于不同功能性低聚糖在物化性质和生理功能上的差异性,不断开发一些具备更新更强益生功能的低聚糖已经成为研究热点。利用糖苷酶对于不同底物的选择特异性,可以得到各种不同结构和功能的低聚糖。目前开展此研究的糖苷酶包括葡聚糖糖苷酶、果聚糖糖苷酶和半乳糖糖苷酶。其中利用 β -半乳糖苷酶的转糖基活性,以乳糖中半乳糖基供体,一系列的糖醇、单糖或二糖作为受体,可以合成几乎无限多样的新型低聚糖,有助于开发特定生理功能的功能性食品,逐渐引起了业内科研工作者的关注。我们将这种异源半乳糖基与不同受体发生反应合成的低聚糖称之为“异低聚半乳糖”(hetero-oligosaccharides,简称HeOS),其分子通式为(Galactose) n -Saccharide。目前,关于异低聚半乳糖(HeOS)制备及其功能活性的研究国内外还鲜有报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种新型功能性低聚糖的制备方法,该方法根据酶对不同底物的选择特异性,以乳糖和纤维二糖、蜜二糖、海藻糖等常见的低聚二糖分别作为混合底物,用来源于植物乳杆菌70810 β -半乳糖苷酶催化转糖基反应,得到的产物通过活性炭 β -硅藻土吸附层析进行分类纯化制得。该制备方法工艺简单,成本低,采用该方法制备得到的低聚糖中三个分子以上低聚糖含量在95%以上,且表现出对肠道益生菌显著的增殖功能活性,同时抑制有害菌生长,是一种非常具有开发利用前景的功能性食品添加剂。

[0006] 本发明的目的是通过以下方式实现的：

[0007] 一种促进肠道益生菌增殖的低聚糖，主要由以下步骤制备得到：

[0008] (1) 将乳糖和双糖受体置于反应容器中，加入50mmol/L磷酸盐缓冲溶液并调整总糖浓度，再121℃，100～105Kpa处理15-25min，使其完全溶解后自然冷却至40～44℃，水浴保温30min；

[0009] (2) 将β-半乳糖苷酶加入上述反应体系，使其浓度达到10～20U/mL 后置于恒温水浴摇床中进行反应；

[0010] (3) 沸水浴灭酶5min以终止反应；

[0011] (4) 将上述反应产物，通过活性炭-硅藻土吸附层析进行分类纯化，去除单糖和双糖，纯化产物经稀释后冷冻干燥，得到本产品。

[0012] 步骤(1)中乳糖和双糖受体按照质量比1:2～1:4混合溶解，磷酸盐缓冲溶液pH6.5～7.5，总糖浓度40～60%；

[0013] 步骤(2)中反应温度40～44℃，摇床转速为150～250r/min；

[0014] 步骤(3)中反应时间为10～14h。

[0015] 本发明中使用的β-半乳糖苷酶源于植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* 70810) 胞外酶，该菌株分离自泡菜，已于2011年7月10日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏号CGMCC No.2843。

[0016] 本发明中β-半乳糖苷酶酶活测定方法如下：

[0017] (1) 测定原理：在适宜温度下，β-半乳糖苷酶可催化易溶于水的无色化合物邻硝基苯-β-D-半乳糖苷(oNPG)水解生成邻硝基苯酚(oNP)，oNP在碱性范围内成呈黄色，且在420nm有最大的吸收峰，根据吸光值的大小结合数学运算可判断酶活力的大小。

[0018] (2) 测定方法：称取2.8mg的oNPG溶于10mL磷酸缓冲液(50mM，pH 6.5)中配制成2mM的oNPG溶液。取1mL预热，加入适当浓度的酶液1mL，于37℃下反应10min，加入4mL的1.0M的碳酸钠溶液终止反应。溶液静置5min后，于420nm处测定产物oNP的吸收值。酶活力单位定义为：β-半乳糖苷酶催化oNPG水解，以每分钟释放1μmol的oNP所需的酶量定义为1个酶活力单位。

[0019] 本发明中低聚糖的分类纯化方法如下：

[0020] (1) 吸附层析中混合填料活性炭-硅藻土预处理：粉末状活性炭在150℃下烘焙2h除去气泡，用40%的盐酸溶液沸水条件下洗涤30min除去金属离子等杂质，再用蒸馏水洗至中性，以1:1的比例与硅藻土混合均匀。湿法匀浆灌柱(3.0×30cm)，待柱床平整后，用2～3倍柱床体积的超纯水进行洗脱，再用相同量的乙醇洗脱，然后再换用相同体积的超纯水洗后待用。

[0021] (2) 按照1.2.1中的方法进行酶反应后，将得到的反应液冷却至室温后5000r/min离心，过滤掉其中的不溶性杂质和变性的酶，得到澄清透明的混合糖液。将AKATA二维液相色谱各部件连接好，在分别与A、B对应的两个储液缸中注满超纯水和乙醇，平衡好层析柱，将上述得到的混合糖液通过进样器注入到层析系统中，运行在主泵的仪表盘已经录入的洗脱程序，开始洗脱过程，洗脱程序如下：

流动相 A: H_2O B: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

分离条件: 5 mL/min 10 min/管

梯度: A: 100% - 95% 0 - 1 h (1 - 6 管)

95% - 95% 1 - 2 h (7 - 12 管)

95% - 85% 2 - 2.5 h (13 - 15 管)

[0022]

85% - 85% 2.5 - 4.5 h (16 - 27 管)

85% - 70% 4.5 - 5 h (28 - 30 管)

70% - 70% 5 - 6 h (31 - 36 管)

70% - 50% 6 - 6.5 h (37 - 39 管)

50% - 50% 6.5 - 7.5 h (40 - 45 管)

[0023] 将得到的洗脱液每隔1管分别利用苯酚-硫酸法和GC法检测,确定产物的纯度和浓度。将已经纯化完全的单一组分归类、合并收集,并通过旋转蒸发仪蒸发掉乙醇和多余水分后冷冻干燥得到无定形的白色粉末。

[0024] (3) 苯酚-硫酸法测定总糖含量:糖在浓硫酸作用下,脱水生成的糠醛或轻甲基糠醛能与苯酚缩合成一种橙红色化合物,在10~100mg范围内其颜色深浅与糖的含量成正比,且在490nm波长下有最大吸收峰,故可用比色法在此波长下测定。具体为吸取100 μL 的待测样液,向其中加入900 μL 的蒸馏水后混匀,再加入0.5mL的苯酚溶液,最后缓慢加入2.5mL浓硫酸,振荡均匀使其显色,待温度降至室温下尽快测定其吸光值。

[0025] 本发明中低聚糖的定量测定方法如下:

[0026] (1) 样品衍生:称取冻干的低聚糖样品约5mg,加入350 μL 2.5%氯化羟胺/吡啶溶液,75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30min;分别加入350 μL 六甲基二硅氮烷和35 μL 三氟乙酸,45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30min;反应混合物8000g离心5min;取上清过0.45 μm 有机滤膜,1 μL 注入GC分析。

[0027] (2) 色谱条件:色谱柱为HP-5毛细管柱(30m \times 0.25mm,0.25 μm);进样口和检测器温度分别是300 $^{\circ}\text{C}$ 和320 $^{\circ}\text{C}$;升温程序:200 $^{\circ}\text{C}$ 保持15min,以3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至260 $^{\circ}\text{C}$,再以1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至280 $^{\circ}\text{C}$,最后以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至310 $^{\circ}\text{C}$,保持10min;载气(N_2)流速:1.0mL/min,进样量1 μL ;分流比40:1。

[0028] (3) 定量方法(内标法):以苯基- β -葡萄糖苷(0.2mg/mL)作为内标,分别配制0.02~2.0mg/mL浓度的(葡萄糖、半乳糖、乳糖、4'-半乳糖基乳糖)标准溶液,制作标准曲线。

[0029] 本发明中低聚半乳糖体外增殖肠道益生菌(乳酸菌)研究方法如下:

[0030] (1) 培养基配制:分别称取一定量的本发明所述低聚糖置于试管中,无菌水溶解,0.22 μm 过滤;然后分别取代MRS培养基中的乳糖作为唯一碳源添加到无菌培养基中,并使终浓度为2%。其它按正常配制,作为试验组。将乳糖和商业化GOS(GOSQHT)做同样的处理,作为对照组。

[0031] (2) 菌种活化:将供试的乳酸菌接种于MRS培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养

48h,酶标仪测定细菌浓度,调整其浓度OD₆₀₀为1.2,备用。

[0032] (3) 生长曲线的测定:将活化好的乳酸菌以2%的接种量,分别添加到试验组和对照组的无菌培养基中,混匀后移入无菌96孔板中,每孔300 μ L,于37℃恒温培养箱中培养48h,每株乳酸菌做三个平行,不接种的培养基作为空白对照。每隔1h,采用多功能酶标仪准确测定发酵液OD₆₀₀,连续测定48h。最后以时间为横坐标,OD₆₀₀为纵坐标,绘制乳酸菌生长曲线,拟合曲线方程,计算 μ_{\max} 和lag。

[0033] 本发明的优点和积极效果在于:

[0034] 1) 本发明中的生产工艺简单,成本低,低聚糖纯度可达95%以上,可规模化生产。

[0035] 2) 本发明采用活性炭 β -硅藻土吸附层析进行低聚糖分类纯化,效果显著,产物中几乎不含单糖和双糖,扩大了受用人群和应用领域。

[0036] 3) 本发明采用来源于食品级微生物植物乳杆菌70810的 β -半乳糖苷酶进行酶法合成,安全性高,可直接应用于各类食品添加。

[0037] 4) 本发明中制备的低聚糖聚合度、单糖残基组成及糖苷键构型复杂多样,除了已表现出的显著增殖肠道益生菌功能活性,还将具有多种潜在的生理功能活性的开发前景。

附图说明

[0038] 图1本发明中酶合成反应产物分离纯化图。

[0039] 图2本发明中酶合成反应产物的GC图。

[0040] 图3本发明中酶合成反应产物增殖肠道益生菌生长曲线图。

具体实施方式

[0041] 下面将结合实施例更详细地描述本发明的优选实施方式。但实施例的具体细节仅用于解释本发明,不以任何方式限制本发明。

[0042] 实施例1

[0043] 将乳糖和蜜二糖受体按1:2置于螺口瓶中,加入pH6.5的50mmol/L磷酸盐缓冲溶液调整总糖浓度至40%,经高压处理(121℃,103Kpa,20min),使其完全溶解后自然冷却至反应温度40℃,水浴保温30min;称取适量 β -半乳糖苷酶加入上述反应体系,使其达到(10U/mL)终浓度后置于恒温水浴摇床(150r/min)中进行反应;反应14h后,沸水浴灭酶5min以终止反应;将上述反应产物,通过活性炭-硅藻土吸附层析进行分类纯化,去除单糖和双糖,纯化产物经稀释后冷冻干燥,得到新型功能性低聚糖。

[0044] 本实施特例制备的低聚糖产量为35.4% (w/w),相对于乳糖和商品化的GOS,表现出了显著的体外增殖益生菌活性,即较高的比生长速率和较短的延滞期,具体结果详见表1。

[0045] 表1实施例1中供试乳酸菌在乳糖或功能性低聚糖为碳源中培养的最大比生长速率和延滞期

[0046]

	<i>L.plantarum</i> 70810		<i>L.casei sudsp.</i> <i>rahamnosus</i> LS-8		<i>L.bulgaricus</i> WG1-2		<i>S.thermophilus</i> MB5-1	
	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag
乳糖	0.172	3.124	0.151	3.865	0.195	3.001	0.176	3.252
GOS _{QHT}	0.221	3.042	0.161	3.547	0.204	2.852	0.202	2.471
实施例 1 所制 低聚糖	0.341	2.458	0.283	3.015	0.265	2.904	0.283	2.125

[0047] 实施例2:

[0048] 将乳糖和纤维二糖受体按1:3置于螺口瓶中,加入pH7.0的50mmol/L 磷酸盐缓冲溶液调整总糖浓度至50%,经高压处理 (121℃,103Kpa, 20min),使其完全溶解后自然冷却至反应温度44℃,水浴保温30min;称取适量 β -半乳糖苷酶加入上述反应体系,使其达到(15U/mL)终浓度后置 于恒温水浴摇床(200r/min)中进行反应;反应12h后,沸水浴灭酶5min以终 止反应;将上述反应产物,通过活性炭-硅藻土吸附层析进行分类纯化,去 除单糖和双糖,纯化产物经稀释后冷冻干燥,得到新型功能性低聚糖。

[0049] 本实施特例制备的低聚糖产量为37.2% (w/w),相对于乳糖和商品化 的GOS,表现出了显著的体外增殖益生菌活性,即较高的比生长速率和较 短的延滞期,具体结果详见表2。

[0050] 表2实施例2中供试乳酸菌在乳糖或功能性低聚糖为碳源中培养的最 大比生长速率和延滞期

[0051]

	<i>L.plantarum</i> 70810		<i>L.casei sudsp.</i> <i>rahamnosus</i> LS-8		<i>L.bulgaricus</i> WG1-2		<i>S.thermophilus</i> MB5-1	
	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag
乳糖	0.212	3.921	0.164	3.921	0.245	3.142	0.198	3.445
GOS _{QHT}	0.244	3.576	0.183	3.412	0.253	2.994	0.282	3.124
实施例 2 所制 低聚糖	0.268	3.315	0.243	2.838	0.261	2.785	0.311	2.954

[0052] 实施例3:

[0053] 将乳糖和海藻糖受体按1:4置于螺口瓶中,加入pH7.5的50mmol/L磷 酸盐缓冲溶液调整总糖浓度至60%,经高压处理 (121℃,103Kpa,20min), 使其完全溶解后自然冷却至反应温度42℃,水浴保温30min;称取适量 β - 半乳糖苷酶加入上述反应体系,使其达到(20U/mL)终浓度后置 于恒温水 浴摇床(250r/min)中进行反应;反应10h后,沸水浴灭酶5min以终止反应; 将上述反应产物,通过活性炭-硅藻土吸附层析进行分类纯化,去除单糖 和 双糖,纯化产物经稀释后冷冻干燥,得到新型功能性低聚糖。

[0054] 本实施特例制备的低聚糖产量为34.6% (w/w),相对于乳糖和商品化 的GOS,表现出了显著的体外增殖益生菌活性,即较高的比生长速率和较 短的延滞期,具体结果,结果详见表3。

[0055] 表3实施例3中供试乳酸菌在乳糖或功能性低聚糖为碳源中培养的最 大比生长速率和延滞期

[0056]

	<i>L.plantarum</i> 70810		<i>L.casei sudsp.</i> <i>rahamnosus</i> LS-8		<i>L.bulgaricus</i> WG1-2		<i>S.thermophilus</i> MB5-1	
	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag
乳糖	0.165	2.954	0.221	3.114	0.199	3.412	0.177	3.447
GOS _{QHT}	0.188	2.455	0.284	2.841	0.241	3.001	0.274	2.984
实施例 3 所制 低聚糖	0.233	2.134	0.351	2.444	0.298	2.589	0.301	2.541

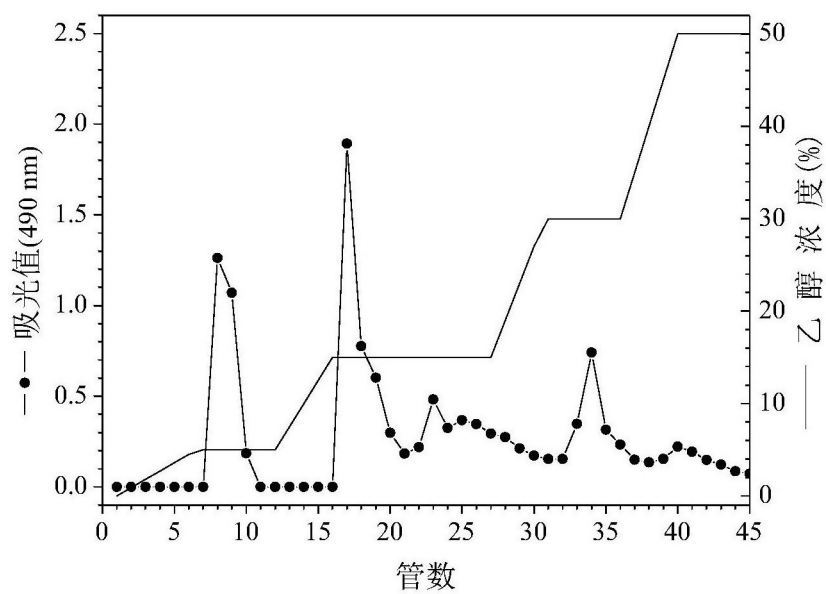


图1

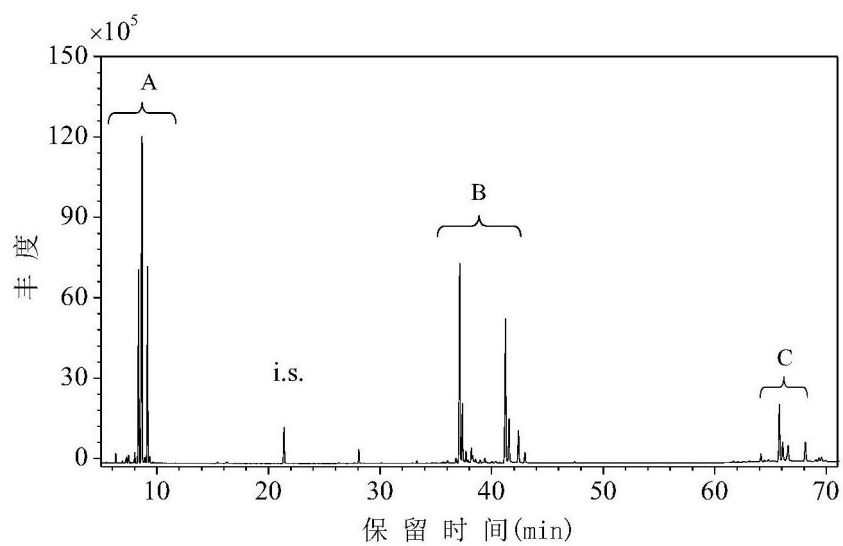


图2

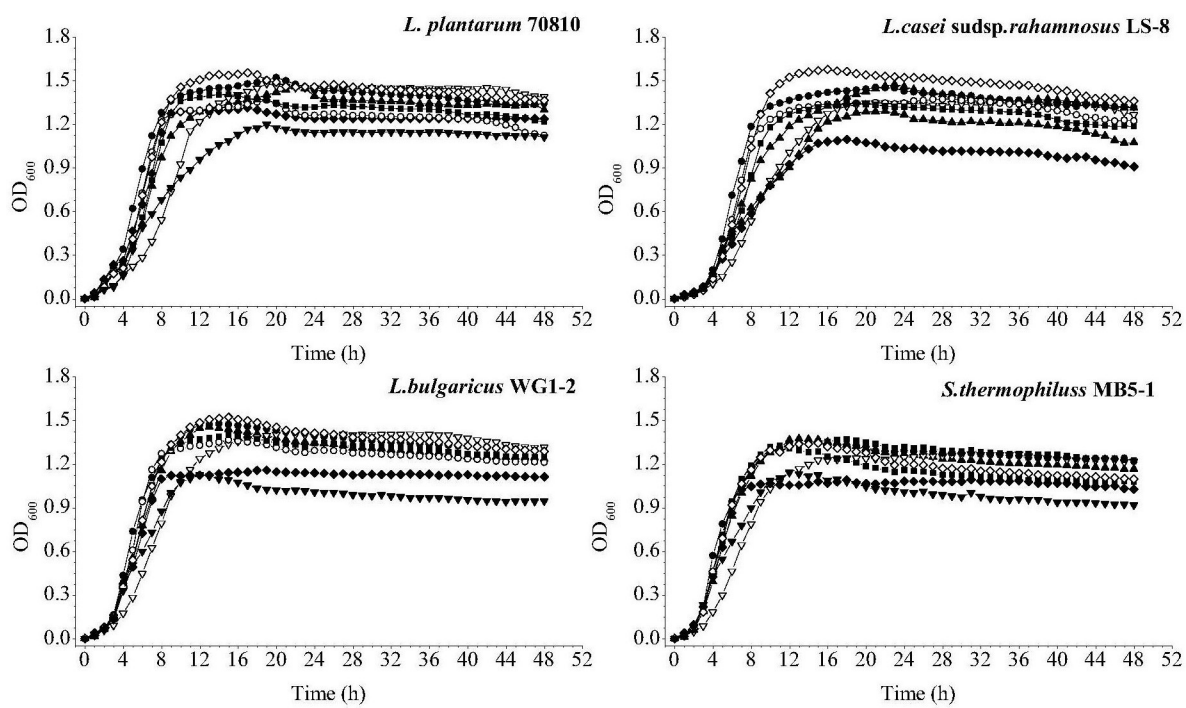


图3