

文章编号:1673-1689(2008)05-0083-03

## 具有 $\beta$ -半乳糖苷酶转苷能力的菌株筛选及鉴定

钟义华<sup>1</sup>, 唐蕾<sup>\*1</sup>, 吴亢<sup>1</sup>, 杨瑞金<sup>2</sup>, 朱松<sup>3</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**以乳糖为唯一碳源,5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-gal)为显色剂,从土壤中筛选出 10 株产  $\beta$ -半乳糖苷酶较高、生长较好的菌株。在 30 °C 下发酵产酶,测定邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷(ONPG)水解能力。在 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中,加入 400 g/L 乳糖和 200 g/L 果糖,并分别添加 10 株菌所产  $\beta$ -半乳糖苷酶,至酶活为 400 U/L,37 °C 下反应 8 h,经高效液相色谱分析,编号为 2-1 样品中含有乳果糖。通过形态特征和 16S rDNA 序列分析,鉴定菌株 2-1 为节杆菌属。

**关键词:**  $\beta$ -半乳糖苷酶; 乳果糖; 16S rDNA

中图分类号:TS 201.3

文献标识码:A

### Screening and Identification of $\beta$ -Galactosidase-Producing Microorganism with Transgalactosylation Activity

ZHONG Yi-hua<sup>1</sup>, TANG Lei<sup>\*1</sup>, WU Kang<sup>1</sup>, YANG Rui-jin<sup>2</sup>, ZHU Song<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Ten strains which produced  $\beta$ -galactosidase were screened from soil using lactose as sole carbon source and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) as indicator. The hydrolysis activity of  $\beta$ -galactosidase was measured using o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) as substrate. The transgalactosylation reaction was performed in 50 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0) containing 400 g/L of lactose, 200 g/L of fructose and 400 U/L of  $\beta$ -galactosidase. The products were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) after 8 h at 37 °C. The reaction mixture of strain 2-1 contained lactulose which suggested that the enzyme produced by this strain exhibited the transgalactosylation activity. The strain was further identified as *Arthrobacter sp.* through 16S rDNA sequence analysis and morphology observation.

**Key words:**  $\beta$ -galactosidase; lactulose; 16S rDNA

收稿日期:2008-07-25.

基金项目:国家 863 计划项目(2006AA10Z336).

作者简介:钟义华(1984-),男,福建福州人,分子生物学硕士研究生.

\* 通讯联系人:唐蕾(1966-),女,江苏无锡人,工学博士,副教授,主要从事生物化学与分子生物学方面的研究.

Email: ltang@jiangnan.edu.cn

乳果糖是人工合成的含酮双糖,又叫乳酮糖、异构乳糖。是指半乳糖和果糖以 $\beta$ 1,4糖苷键结合,其化学名为4-O- $\beta$ 吡喃型半乳糖-D-果糖。乳果糖易溶于水,甜度是蔗糖的50%,在受热和低pH值时较稳定。乳果糖对肠道内有益菌双歧杆菌、乳酸杆菌等有较强的增殖效果,可用于治疗便秘、肝性脑病和降低血内毒素,此外它还具有补充人体营养、延缓衰老和保健作用<sup>[1]</sup>。目前,乳果糖的生产主要是用碱液处理将乳糖异构化成乳果糖,在该法生产乳果糖的过程中,产生的有色副产物难以去除,造成分离纯化成本高,而且碱液对乳果糖的降解降低了乳果糖的产量<sup>[2]</sup>。采用酶法合成乳果糖可利用 $\beta$ 半乳糖苷酶,以乳糖和果糖为底物合成乳果糖,产物清洁无有害,分离纯化过程简单,能够实现高效、经济、环境友好型生产。

$\beta$ 半乳糖苷酶(EC. 3. 2. 1. 23)又称乳糖酶,广泛存在于动物、植物和微生物中,该酶不仅能水解乳糖生成半乳糖和葡萄糖,而且具有转半乳糖基作用,以乳糖或其水解产物半乳糖和葡萄糖为糖基受体,合成半乳糖苷键,生成低聚半乳糖<sup>[3-5]</sup>。近年来有学者利用 $\beta$ 半乳糖苷酶的转半乳糖基作用,以果糖为糖基受体合成乳果糖<sup>[1,6]</sup>。作者以乳糖为唯一碳源,X-gal为显色剂,筛选得到10株具有 $\beta$ 半乳糖苷酶活力的菌株,其中1株同时具有转糖能力,经形态与分子生物学鉴定该菌为节杆菌属。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

实验材料:果园中采集的土壤样品;

筛选培养基:乳糖2 g/dL、酵母膏0.5 g/dL、蛋白胨1 g/dL、X-gal 0.03 g/dL、琼脂2 g/dL,pH 7.0,121℃灭菌20 min。

Quanta-2000电子显微镜:荷兰FEI公司制造;TGL-16G离心机:上海安亭科学仪器厂制造;DYY-8C电泳仪:北京六一仪器厂制造;PCR仪:Thermo Hybaid公司制造;旋转式恒温摇瓶柜:上海苏坤实业有限公司制造;Waters 600高效液相色谱仪:美国Waters公司制造。

### 1.2 实验方法

**1.2.1  $\beta$ 半乳糖苷酶产生菌的初筛** 取土样1 g置于10 mL水中,从 $10^{-1}$ 依次稀释到 $10^{-8}$ ,分别涂布于筛选培养基,30℃培养48 h,挑取蓝色菌落,划线分离,获得纯培养后斜面保存。

**1.2.2  $\beta$ 半乳糖苷酶水解活力测定** 将初筛的菌株接种于无X-gal的液体筛选培养基中,30℃、200

r/min振荡培养60 h,离心收集菌体,菌体重悬于50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.0),超声破碎、离心制成粗酶液。在试管中加入2.5 mL、10 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.0),37℃恒温水浴预热后,加入100  $\mu$ L 4 mg/mL ONPG溶液和100  $\mu$ L酶液,37℃恒温反应5 min,加1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液终止反应,OD<sub>420</sub>nm比色。采用国际酶活单位,规定1 min催化ONPG水解生成1  $\mu$ mol邻硝基酚的酶量为一个酶活单位(U)。

**1.2.3  $\beta$ 半乳糖苷酶转糖基活性测定** 将酶液的水解活力调整到400 U/L,添加400 g/L乳糖和200 g/L果糖,在37℃下反应8 h,煮沸10 min使酶失活,反应液经适当稀释,用0.2  $\mu$ m滤膜过滤,采用高效液相色谱(HPLC)方法分析反应产物,色谱分析的流动相为纯水,体积流量为0.4 mL/min,进样体积为10  $\mu$ L;色谱柱为Sugerpar1柱(300 mm  $\times$  6.5 mm),柱温85℃。

**1.2.4 16S rDNA序列分析** 细菌总DNA的提取为:离心收集菌体,-20℃冷冻后加石英砂研磨,反复3次,用溴代十六烷基三甲胺(CTAB)法提取。PCR扩增引物为细菌16S rDNA通用引物,正向引物为:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3';反向引物为:5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'。PCR反应体系(50  $\mu$ L),终质量浓度为18 mg/L的模板、0.1  $\mu$ mol/L的引物、200  $\mu$ mol/L的dNTP, Taq聚合酶5 U,1 $\times$ PCR缓冲液。反应条件:94℃变性1 min,58℃退火1 min,72℃延伸1 min 40 s,共32个循环,PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,回收条带送南京金斯特生物工程有限公司测序。

## 2 结果与讨论

### 2.1 转糖基 $\beta$ 半乳糖苷酶产生菌的筛选

利用 $\beta$ 半乳糖苷酶分解X-gal形成蓝色化合物的特点,首先从固体平板上挑取变色圈大的或颜色深的菌落,划线分离纯化后得到单菌株。选取ONPG水解能力强、且生长状况较好的10株菌,进一步进行乳糖转糖基反应。表1列出了10株菌的 $\beta$ 半乳糖苷酶水解活性。其中菌株2-1所产酶液在以乳糖和果糖为底物的转糖基反应中,经HPLC检测,12.426 min的洗脱峰和乳果糖标样洗脱时间12.472 min的基本吻合,见图1。表明该菌产生的 $\beta$ 半乳糖苷酶具有一定的转半乳糖基活性,而其他9株菌的酶反应液中均未检测到乳果糖,为此对菌株2-1进行进一步的菌种鉴定。

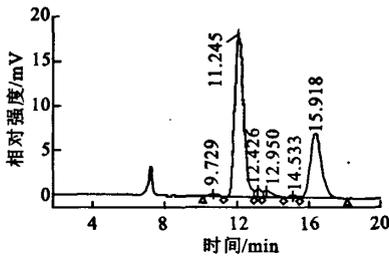


图 1 样品高压液相色谱图

Fig. 1 HPLC profile of lactulose

表 1 10 株菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的水解活性

Tab. 1 Hydrolysis activity of  $\beta$ -galactosidase of ten strains

菌株编号	酶活/(U/mL)
2-1	0.83
2	0.81
3	1.10
4	1.21
5	2.04
7	1.32
10	1.50
2-2	2.30
2-3	1.84

## 2.2 菌株 2-1 鉴定结果

2.2.1 菌株形态特征 电镜照片见图 2。菌株 2-1 为杆状,大小为  $(0.4 \sim 0.6) \mu\text{m} \times (1.4 \sim 2.0) \mu\text{m}$ ,革兰氏染色为阳性。

2.2.2 16S rDNA 的克隆及其序列分析 PCR 扩增获得菌株 2-1 的 16S rDNA 核苷酸片段,序列测定结果显示为 1 413 bp,将其进行 BLAST 同源性比较,与节杆菌已经发表的 *Arthrobacter. sp* HSL-2

和 *Arthrobacter sp.* PZC6 的 16S rDNA 核苷酸序列的相似性为 100%。与 *Arthrobacter nicotovorans* 16S rDNA、*Arthrobacter sp.* BS11 和 *Arthrobacter histidinovorans* 的 16S rDNA 核苷酸序列的相似性为 99%。

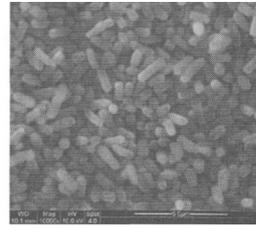


图 2 菌株 2-1 的扫描电镜照片

Fig. 2 Electronic microscope graph of strain 2-1

## 3 结 语

使用酶法合成乳糖糖首先要选择具有高效转糖基活性的酶源,微生物由于生存环境和代谢途径的多样性及大量培养的实用性成为新酶的主要来源。在大肠杆菌、米曲霉、芽孢杆菌、脆壁克鲁维酵母、乳酸克鲁维酵母、硫磺硫化叶菌等多种微生物中均发现新的具有转糖基活性的  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[7]</sup>。作者从土壤中筛选出一株产生转糖基  $\beta$ -半乳糖苷酶的菌株,经过分子生物学 16S rDNA 序列比对,结合扫描电镜形态学分析,鉴定该菌株为节杆菌属。在已发表的文献中还未见利用来源于 *Arthrobacter sp.* 的  $\beta$ -半乳糖苷酶催化合成乳糖糖的研究,正在进行该菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的克隆和分子改造,以进一步提高  $\beta$ -半乳糖苷酶的水解及转糖基活性。

## 参考文献 (References):

- [1] Lee Y J, Kim C S, Oh D K. Lactulose production by  $\beta$ -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(6):787-793.
- [2] Aider M, Halleux D D. Isomerization of lactose and lactulose production: review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18: 356-364.
- [3] 王红妹,肖敏,李正义,等. 转糖基  $\beta$ -半乳糖苷酶产生菌筛选和鉴定及酶催化生成低聚半乳糖[J]. 山东大学学报, 2006, 41(1): 133-139.  
WANG Hong-mei, XIAO Min, LI Zheng-yi, et al. Screening and identification of  $\beta$ -galactosidase-producing microorganism and enzymatic of galacto-oligosaccharides using its transgalactosylation[J]. *Journal of Shandong University*, 2006, 41(1): 133-139. (in Chinese)
- [4] Onishi N, Tanaka T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing  $\beta$ -galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(11):4026-4030.
- [5] Hung M N, Lee B H. Purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(4):439-445.
- [6] Kim Y S, Park C S, Oh D K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(4): 903-908.
- [7] 郑建仙. 功能性食品生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 64-69.

(责任编辑:李春丽)