DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2017.06.006

具有转糖苷活性 β-半乳糖苷酶菌株的筛选鉴定

朱运平[1,2]，许丽亚[3]，范光森[1]，吴 成[2]，李秀婷[*1,3]

（1. 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心，北京 100048；2. 北京市食品添加剂工程技术研究中心，北京 100048；3. 北京工商大学 食品质量与安全北京实验室，北京 100048）

摘要： 为了获得具有较高酶活力的 β-半乳糖苷酶，以乳糖为诱导剂，采用涂有 x-gal 的鉴别平板分离初筛得到 28 株生长较好的产 β-半乳糖苷酶的菌株。通过摇瓶复筛测定其水解酶活，从中筛选出 4 株酶活力较高的菌株，并利用高效液相检测菌株的转糖基活性，确定了一株具有转糖苷活性菌株 B5582Y，其初始水解酶活可达 12 U/mL。根据细胞形态、生理生化数据、16S rDNA 序列和 rpoB 功能基因序列数据多项鉴定分析，最终确定该菌 B5582Y 为克雷伯氏菌（*Klebsiella michiganensis*）。

关键词： β-半乳糖苷酶；菌株筛选；分离；鉴定

中图分类号：Q 814.9　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2017)06—0598—06

Screening and Identification of β-Galactosidase-Producing Microorganism with Transgalactosylation Activity

ZHU Yunping[1,2]，*XU Liya*[3]，*FAN Guangsen*[1]，*WU Cheng*[2]，*LI Xiuting*[*1,3]

（1. Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health，Beijing 100048，China；2. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives，Beijing 100048，China；3. Beijing Laboratory for Food Quality and Safety，Beijing Technology & Business University，Beijing 100048，China）

Abstract： In order to obtain high enzyme activity of β-galactosidase，twenty-eight strains which produced β-galactosidase were screened from soil using lactose as inducer and X-gal as indicator. Four strains which have higher hydrolysis enzyme activity were screened by shake flask culturing. One strain B5582Y which have both of hydrolysis and transgalactosylation Activity was screened by HPLC，its hydrolysis of initial enzyme activity can reach upwards of 12 U/mL. And it was identified as *Klebsiella michiganens* is according to the cell morphology，physiological and biochemical characteristics，16SrDNA and rpoB functional gene sequence.

Keywords： β-galactosidase，screening of microorganism，separation，identification

收稿日期： 2016-05-21

基金项目： 国家自然科学基金项目(31371723)；北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划项目(IDHT20130506)。

作者简介： 朱运平(1980—)，女，重庆人，工学博士，副教授，主要从事功能性食品方面的研究。E-mail：Zhuyp@th.btbu.edu.cn

*** 通信作者：** 李秀婷(1970—)，女，河南周口人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail：lixt@th.btbu.edu.cn

引用本文： 朱运平，许丽亚，范光森，等. 具有转糖苷活性 β-半乳糖苷酶菌株的筛选鉴定[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(06)：598-603.

β-半乳糖苷酶属于糖苷水解酶，某些还具有一定的转糖基活性，乳糖或乳糖类似物可以作为诱导物促进它在微生物体内的合成表达[1-2]，β-半乳糖苷酶在工业中的应用非常广泛，可以防止浓缩乳制品结晶，降低乳制品中乳糖含量，用于低聚糖的生产等[3-6]。当底物为高浓度的乳糖时，β-半乳糖苷酶可以利用自身的水解和转糖苷活性将乳糖水解、转化为低聚半乳糖。低聚半乳糖(GOS)是一种功能性低聚糖，由于它具有多个亲水基团，且不被人体唾液和胃中酶类分解[7]，仅被少量肠道益生菌利用，故亦被称为水溶性膳食纤维，从而改善人体健康状况，而食物中天然存在的GOS含量往往很低，因此通过筛选获得具有转糖苷活性的菌株用于GOS的生产具有很好的应用价值。

不同微生物来源的β-半乳糖苷酶的水解活性和转糖苷活性的比例不同。某些微生物，如黑曲霉、乳酸克鲁维酵母、脆壁克鲁维酵母等所产生的β-半乳糖苷酶具有较强的水解活性；而在保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和米曲霉等[8]所产生的β-半乳糖苷酶则具有较强的转糖苷活性[9-13]。工业用β-半乳糖苷酶主要来源于微生物，但目前的天然产酶菌株的产酶活力普遍较低，优良天然菌株资源匮乏，因此筛选新型高产β-半乳糖苷酶优良菌株具有重要意义。

目前，我们通过利用涂有x-gal的鉴别培养基对产β-半乳糖苷酶菌株进行筛选，并经过摇瓶发酵，测定菌株的水解活力和转糖苷活力，确定了一株天然水解酶活较高，并具有转糖苷活性的菌株，通过对菌株进行形态学、分子生物学和生理生化试验分析，鉴定该菌株为克雷伯氏菌(*Klebsiella michiganensis*)，扩充了我国产β-半乳糖苷酶菌株的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳糖、半乳糖、氢氧化钠(均为分析纯)、2-硝基酚(oNP)(指示剂)、蛋白胨、5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-gal)、邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(oNPG)、酵母浸膏和牛肉膏，均为生化试剂、乙腈(色谱纯)；DNA Marker、dNTP、RNaseA、Taq DNA Polymerase：日本TAKALA公司产品。

1.2 培养基

1.2.1 筛选培养基(g/L) 乳糖10，胰蛋白胨10，酵母浸膏5，NaCl 5；pH 7.0，固体培养基加琼脂20。121 ℃高压蒸汽灭菌20 min。

1.2.2 斜面保藏培养基(g/L) 乳糖10，胰蛋白胨10，酵母浸膏5，NaCl 5，琼脂20；pH 7.0。121 ℃高压蒸汽灭菌20 min。

1.2.3 增殖培养基(g/L) 胰蛋白胨10，酵母浸膏5，NaCl 5；pH 7.0。121 ℃高压蒸汽灭菌20 min。

1.3 实验步骤

β-半乳糖苷酶产生菌的筛选及鉴定流程

培养基配制→菌种初筛→菌种纯化与斜面保藏→

↓

x-gal显色

菌种复筛→酶活测定→菌株鉴定

1.4 产酶菌株的筛选

1.4.1 菌种初筛 将灭菌后的固体培养基倒入灭菌的平皿中待凝固，在每个平皿中加入40 mL DMF溶液(20 mg/mL x-gal)并涂布均匀。称取0.1 g土样置于0.9 mL无菌水中，混和均匀后取适当梯度稀释，移取100 μL菌液均匀涂布于筛选培基平板上，倒置放置于37 ℃培养箱中培养24~48 h。

从筛选培养基平板上挑取周围带有蓝色水解圈的单菌落划线反复划线，直至得到纯培养物后转接斜面保藏。

1.4.2 菌种复筛 将分离、纯化后的菌株分别挑取2环接入增殖培养基中，37 ℃、180 r/min培养24 h，再以体积分数2%接入到装有50 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中，在相同的条件下培养24 h。取粗酶液测定β-半乳糖苷酶的水解酶活，筛选β-半乳糖苷酶高产菌株。

1.4.3 粗酶液制备 参考赵瑞香等人[14]破壁方法，并稍加改进。取发酵液于4 ℃、8 000 r/min下冷冻离心10 min，将菌体沉淀用pH 6.7的PBS(钠盐)洗涤离心两次后，再次加入与发酵液相同体积的pH 6.7 PBS缓冲液，冰水浴超声处理(500 W，超声1.5 s，间歇2 s)10 min，然后4 ℃、8 000 r/min下冷冻离心10 min，取上清液，即为β-半乳糖苷酶的粗酶液。

1.4.4 β-半乳糖苷酶水解酶活测定

1)oNP标准储备液配制及标准曲线的绘制[5]：用0.05 mol/L、pH 6.7的PBS缓冲液配制0.2 mg/mL的oNP溶液，将其分别以0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL

的体积加入各个试管，后向各试管中补充PBS至1 mL,于50 ℃恒温水浴锅中保温10 min,后分别加入4 mL的0.5 mol/L的Na_2CO_3溶液,以第一管为空白管,测定各管在波长420 nm处的吸光度,以oNP质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

2）水解酶活测定方法：测定方法参考Gul-Guvend[15]等人方法,稍作改动。准确称取一定量的oNPG，用0.05 mol/L、pH 6.7的PBS配制2 mg/mL的oNPG溶液，取2 mL上述溶液于试管中50 ℃保温10 min,然后加入0.5 mL适当稀释的酶液,振荡混匀后在50 ℃下反应10 min，加入2.5 mL的0.5 mol/L Na_2CO_3溶液终止反应(对照管先加Na_2CO_3溶液再加酶液)，在420 nm下测定样品的吸光度,根据oNP标准曲线计算酶活力。

水解酶活力单位(UoNPG)定义[4]:在上述条件下,酶催化oNPG反应1 min生成1 μmol的oNP所需酶量定义为1个酶活力单位。

1.4.5 β-半乳糖苷酶转糖苷活力测定 参考陈真真等人转糖苷活力测定方法[4],利用HPLC外标法测定。用0.05 mol/L、pH 6.7的PBS缓冲液配制0.5 mol/L的乳糖溶液,取500 μL上述溶液置于离心管中,50 ℃保温10 min后加入1 000 μL酶液，振荡混匀继续反应4 h，然后放入沸水浴中煮沸10 min灭酶。取适量酶解后液体经0.22 μm微孔过滤器过滤后，经HPLC检测乳糖酶水解活性与低聚半乳糖的生成情况。

色谱测定条件:Agilent 1260高效液相色谱-示差折光检测器;色谱柱:Inertsil HPLC Column NH_2 5 μm、4.6 mm×250 mm;柱温:30 ℃;流动相:$V_{乙腈}$:$V_{水}$=70:30;流速:1.0 mL/min。

1.5 菌株鉴定

1.5.1 形态学鉴定 将纯化后的菌转接到平板上观察其培养特征，挑取单菌落进行革兰氏染色,并观察其细胞形态。

1.5.2 分子生物学鉴定

1)菌体的培养:将斜面保藏的菌株在平板上划线活化,培养12 h后挑取单菌落接种到50 mL液体培养基中,37 ℃、200 r/min培养12 h。

2）基因组DNA提取：具体操作见OMEGA Bacterial DNA Kit试剂盒,将获取到基因组DNA测序。

3)16S rDNA序列分析:PCR扩增正向引物F:5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′,反向引物R:5′-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3′。16S rDNA序列扩增体系为10×PCR Buffer (Mg^{2+}Plus)5 μL,dNTP Mixture (2.5 mmol/L)8 μL，引物F(10 μmol/L)1 μL,引物R(10 μmol/L)1 μL,模板DNA 1 μL,Taq酶(5 U/μL)0.5 μL,ddH_2O 33.5 μL,总体积为50 μL。16S rDNA序列扩增反应条件:95 ℃变性5 min;95 ℃变性60 s,57 ℃退火60 s,72 ℃延伸90 s,30个循环;72 ℃延伸5 min。

1.5.3 生理生化鉴定 参照BIOLOG GEN III说明书。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

2.1.1 菌株初筛及水解酶活测定 将土样稀释液均匀涂布于筛选平板，由于β-半乳糖苷酶可将x-gal水解成为蓝色络合物，初筛共获得28株显蓝色菌株。对显蓝色菌株进行摇瓶复筛,测定水解酶活,有4株酶活力较高,见表1。菌株B5582Y水解酶活力最高,酶活可达12 U/mL,这比陈真真[4]、郭志华[16]等人筛选的天然菌株的优化前酶活高,与高兆建等人[17]筛出的嗜热脂肪芽孢杆菌的优化前的酶活相当,因此,作为原始菌株酶活,B5582Y具有较好的研究前景。

表1 4株产β-半乳糖苷酶水解活性

Table 1 β-galactosidase activity of four strains

菌株编号	水解酶活力/(U/mL)
B5582Y	12.3±0.05
B3371Y	1.02±0.08
B1508Y	1.72±0.05
B1891	0.783±0.02

2.1.2 菌株初转糖苷活力测定 利用外标法通过HPLC对3.1.1中筛选得到的4株菌所产的β-半乳糖苷酶进行转糖苷活性检测，经分析只有B5582Y所产乳糖酶具有转糖苷活力,见图1。乳糖的出峰时间为8.557 min,葡萄糖的出峰时间为6.302 min,半乳糖出峰时间为6.623 min。经过4 h的酶解过程,见图2。乳糖水解率大于90%,因此该酶具有良好的水解特性,在生成葡萄糖和半乳糖的同时生成不同相对分子质量的低聚糖,可知该菌株产酶具有转糖苷活性。目前,国内关于对具有转糖苷活性的β-半乳糖苷酶的研究尚不广泛，故选取菌株B5582Y,为

后续相关酶学性质的研究提供基础。

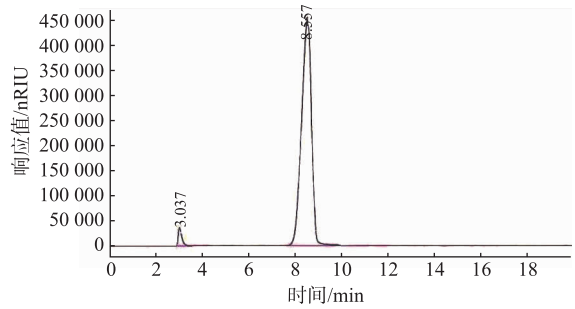


图 1　酶解前乳糖底物 HPLC 图

Fig. 1　HPLC of the initial lactose

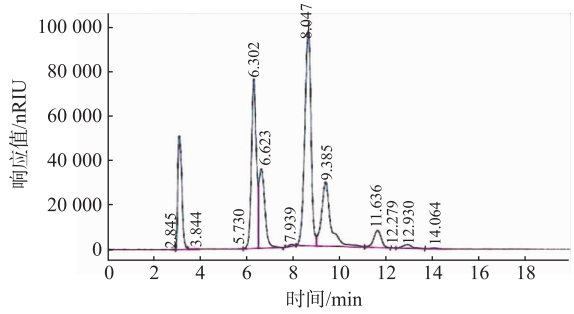


图 2　酶解后产物的 HPLC 图

Fig. 2　HPLC of products produced by β-galactosidase from B5582Y

2.2　菌株鉴定

2.2.1　菌株形态学鉴定　在固体培养基上 B5582Y 菌落形态见图 3。呈圆形,中间凸起,表面光滑、粘稠,不易挑取。经革兰氏染色后呈红色,显微镜观察为革兰氏阴性菌短杆菌,见图 4。通过对菌体进行结晶紫染色,菌体无中空状态,因此无芽孢生成。

2.2.2　菌株分子生物学鉴定　对 B5582Y 进行全基因组提取,以全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到 16S rDNA 核苷酸片段并测序,将得到的 16S rDNA 序列提交到 NCBI 数据库中进行 BLAST 在线同源性比对分析(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast),通过构建系统发育树(见图 5)可知,B5582Y 为克雷伯氏菌(*Klebsiella michiganensis*)。



图 3　B5582Y 菌落形态

Fig. 3　Colony morphology of B5582Y



图 4　B5582Y

Fig. 4　Gram stain of B5582Y

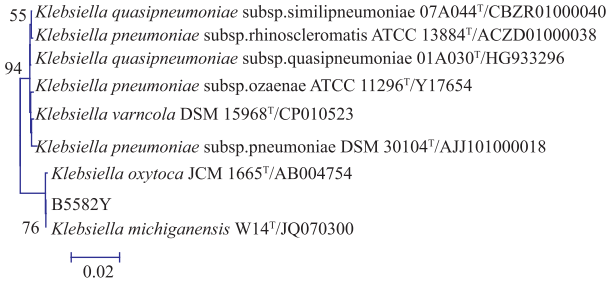


图 5　B5582Y 系统发育树

Fig. 5　Genetic system development tree of B5582Y

2.2.3　菌株生理生化鉴定　对菌株 B5582Y 进行 BIOLOG GEN III 生理生化试验,结果见表 2。

表 2　菌株 B5582Y 生理生化试验结果

Table 2　Physiological and biochemical characteristics of strain B5582Y

试验项目	结果	试验项目	结果	试验项目	结果	试验项目	结果
阴性对照	–	a-D-葡萄糖	+	明胶	–	p-羟基苯乙酸	–
糊精	w	D-甘露糖	+	甘氨酸-L-脯氨酸	–	丙酮酸甲酯	w
D-麦芽糖	+	D-果糖	+	L-丙氨酸	–	D-乳酸甲酯	–
D-海藻糖	+	D-半乳糖	+	L-精氨酸	–	L-乳酸	w

试验项目	结果	试验项目	结果	试验项目	结果	试验项目	结果
D-纤维二糖	+	3-甲基-D-葡萄糖	-	L-天冬氨酸	w	柠檬酸	+
龙胆二糖	+	D-岩藻糖	-	L-谷氨酸	-	α-酮戊二酸	-
蔗糖	+	L-岩藻糖	-	L-组氨酸	-	D-苹果酸	-
松二糖	-	L-鼠李糖	-	L-焦谷氨酸	-	L-苹果酸	-
水苏糖	+	肌苷	w	L-丝氨酸	+	溴代丁二酸	-
阳性对照	+	1%乳酸钠	+	林可霉素	+	萘啶酸	+
pH 6.0	+	夫西地酸	+	盐酸胍	+	氯化锂	+
pH 5.0	+	D-丝氨酸	+	十四烷硫酸钠	+	亚碲酸钾	-
D-棉子糖	+	D-山梨醇	+	果胶	+	吐温 40	-
α-D-乳糖	+	D-甘露醇	+	D-半乳糖醛酸	+	γ-氨基丁酸	-
D-蜜二糖	+	D-阿糖醇	+	L-半乳糖酸内酯	+	α-羟丁酸	-
β-甲基-D-葡糖苷	+	肌醇	w	D-葡糖酸	+	β-羟基-D,L-丁酸	-
D-水杨苷	+	甘油	w	D-葡萄糖醛酸	+	α-丁酮酸	-
N-乙酰-D-葡糖胺	+	D-葡糖-6-磷酸	+	葡糖醛酰胺	+	乙酰乙酸	-
N-乙酰-β-D-甘露糖胺	-	D-果糖-6-磷酸	+	粘酸	+	丙酸	-
N-乙酰-D-半乳糖胺	+	D-天冬氨酸	-	奎宁酸	-	乙酸	-
N-乙酰神经氨酸	+	D-丝氨酸	+	糖质酸	+	甲酸	+
1%NaCl	+	醋竹桃霉素	+	万古霉素	+	氨曲南	+
4%NaCl	w	利福霉素 SV	+	四唑紫	+	丁酸钠	w
8%NaCl	-	二甲胺四环素	-	四唑蓝	+	溴酸钠	-

注:“+”代表阳性,“-”代表阴性,“w”代表弱阳性。

3 结 语

β-半乳糖苷酶在食品工业中的应用非常广泛,它可以防止浓缩乳制品结晶,降低乳制品中乳糖含量,用于低聚糖的生产等。作者从天然土样中筛选出一株初始水解酶活力达 12 U/mL,并具有转糖苷活力的菌株 B5582Y。通过传统形态学、生理生化和分子生物学的方法对 B5582Y 进行菌株鉴定,确定该菌为克雷伯氏菌(*Klebsiella michiganensis*)。目前关于产 β-半乳糖苷酶的微生物主要见于大肠杆菌、乳酸菌、米曲霉、脆壁克鲁维酵母、乳酸克鲁酵母等中,关于克雷伯氏属菌株产 β-半乳糖酶的报道较少,因此作为一株新型产酶菌株,且具有较高原始产酶活力和较好的转糖苷活性的细菌,菌株 B5582Y 具有良好的研究价值,不仅扩充了我国产 β-半乳糖苷酶初始菌株的菌种资源,也为后续分子生物学方面的研究提供了较好的资源。

参考文献:

[1] TORRES D P M,GONCALVES M D P F,TEIXEIRA J A,et al. Galacto-oligosaccharides:production,properties,applications,and significance as prebiotics[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety**,2010,9(5):438-454.

[2] WANG Xin,HOU Jumin,FU Lili,et al. β-galactosidase enzyme production of lactic acid bacteria screening and beneficial nature research[J]. **China´s Dairy Industry Journal**,2012(8):20-23.(in Chinese)

[3] ZHANG Li,LI Qingzhang,TIAN Lei. β-galactosidase enzyme research progress [J]. **Journal of Northeast Agricultural University**,2009(7):128-131.(in Chinese)

[4] 陈真真. β- 半乳糖苷酶菌株筛选、酶的分离纯化和性质及酶法合成低聚半乳糖的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.

[5] 孟繁一. β- 半乳糖苷酶产生菌的筛选与发酵[D]. 大连:大连工业大学,2013.

[6] LI Qiangjun,QUAN Wenhai. The enzymatic hydrolysis of lactose in whey[J]. **Journal of the Wuxi Institute of Light Industry**,1991(3):15-23.(in Chinese)

[7] MUSSATTO S I,MANCILHA I M. Non-digestible oligosaccharides:a review[J]. **Carbohydrate Polymers**,2007,68(3):587-

597.

[8] ZHOU Chunlei, YU Yong, LI Huirong, et al. Screening and identification of cold-active β-galactosidase-producing bacterium and characterization of the β-galactosidase[J]. **Chinese Journal of Polar Research**, 2010(1): 48-55. (in Chinese)

[9] 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.

[10] 张博. 产冷活性 β- 半乳糖苷酶低温菌株的筛选及产酶条件的优化[D]. 广东:广东药学院, 2011.

[11] 沈莲莲. 低温乳糖酶产生菌株的选育、产酶条件优化及其粗酶性质研究[D]. 无锡:江南大学, 2013.

[12] CAREVIC M, VELICKOVIC D, STOJANOVIC M, et al. Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by β- galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. **Process Biochemistry**, 2015, 50(5): 782-788.

[13] ZHONG Yihua, TANG Lei, WU Kang, et al. Screening and identification of β-galactosidase-producing microorganism with transgalactosylation activity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008(5): 83-85. (in Chinese)

[14] ZHAO Ruixiang, WANG Dahong, NIU Shengyang, et al. Ultrasonic cell crushing method for detection of *Lactobacillus acidophilus* β-galactosidase enzyme activity research[J]. **Food Science**, 2006(1): 47-50. (in Chinese)

[15] GUL G R, GUVEN K, POLI A, et al. Purification and some properties of a β-galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclo bacillus acidocaldarius*, subsp. *rittmannii*, isolated from Antarctica[J]. **Enzyme & Microbial Technology**, 2007, 40(6): 1570-1577.

[16] GUO Zhihua, KONG Wentao, KONG Jian. Screening of *Bacillus* producing β-galactosidase and optimization of its enzyme production conditions[J]. **Journal of Anhui Agricultural Science**, 2009(10): 4404-4408. (in Chinese)

[17] GAO Zhaojian, SUN Huigang, HOU Jinhui. Screening of a novel microorganism producing thermostable β-galactosidase and its characterization[J]. **Food Science and Technology**, 2011(5): 23-28. (in Chinese)

会　议　消　息

会议名称(中文):第 26 届高压科学与技术国际会议暨第 8 届亚洲高压科技学术会议

会议名称 (英文):The 26th International Conference on High Pressure Science and Technology & VIII Asian Conference on High Pressure Research

所属学科:基础物理学,高分子化学与物理,地球物理,生物技术与生物工程

开始日期:2017-08-19　　结束日期:2017-08-23

所在城市:北京市　朝阳区　　具体地点:中国国家会议中心 (北京市朝阳区天辰东路 7 号)

主办单位:国际高压科学与技术联合会

协办单位:(1)中国晶体协会;(2)中国材料协会;(3)中国物理协会

承办单位:中科研物理研究所　　会议主席:毛河光(名誉主席)

组织委员会主席:靳常青; 刘浩哲(共同);赵予生(共同)

联系人:望贤成　　联系电话:82648041　　E-MAIL:airapt26@iphy.ac.cn or wangxiancheng@iphy.ac.cn

会议网站:http://www.airapt26.org/venue.htm

会议背景介绍:The International Association for the Advancement of High Pressure Science and Technology (AIRAPT) meets once every two years since 1955. Since the seminal findings of Prof. P.W. Bridgman, high pressure has taken a more and more important role in a wide range of scientific fields such as physics, chemistry, biology, materials science, earth and planetary science, food science, etc. This conference is the 26th AIRAPT. Especially the AIRAPT 26 will be combined with the 8th Asian Conference of High Pressure Research (ACHPR 8). The joint conferences will be held at the National Convention Center located in the green Olympic Park venue in Beijing.