



研究报告

一株产低温 β -半乳糖苷酶微杆菌的筛选鉴定、产酶条件及其酶学特性

张宇洁 王丽军 李梦 顾燕玲 关波* 倪永清

石河子大学食品学院 新疆 石河子 832002

摘要: 【背景】低温 β -半乳糖苷酶能在低温下仍保持较高的乳糖水解活性, 筛选酶学特性适合在牛乳体系中高效水解乳糖的 β -半乳糖苷酶生产菌株, 是低乳糖牛乳加工产业关注的焦点。【目的】对天山中国一号冰川沉积物中分离的一株产低温 β -半乳糖苷酶菌株的产酶条件和酶学特性进行研究。【方法】结合 X-Gal 平板法初筛和测定粗酶液酶活复筛, 获得产低温 β -半乳糖苷酶的菌株。通过形态学、生理生化试验及 16S rRNA 基因测序分析对筛选菌株进行鉴定, 单因素摇瓶实验优化菌株的产酶条件, 硫酸铵分级沉淀初步纯化 β -半乳糖苷酶并对其酶学特性进行分析。【结果】通过形态学、生理生化特征和 16S rRNA 基因鉴定, 确定菌株 LW106 为微杆菌属(*Microbacterium*) 菌株; 该菌株最适产酶温度为 25 °C, 最佳产酶碳源为可溶性淀粉, 培养基初始 pH 为 7.0, 接种量为 3%; 对初步纯化的低温 β -半乳糖苷酶酶学性质的研究表明, LW106 所产 β -半乳糖苷酶的最适 pH 为 6.0, 最适反应温度为 35 °C, 4 °C 时酶活为最大酶活的 78%, 4 °C 和 pH 7.0 时的稳定性最好, 10 mmol/L 的 Na^+ 对酶活性基本没有抑制作用, Ca^{2+} 对酶活性具有一定的激活作用。【结论】菌株 LW106 所产低温 β -半乳糖苷酶的酶学特性表明该酶在乳品低温加工领域具有进一步研究和应用的价值。

关键词: 低温 β -半乳糖苷酶, 微杆菌, 中国一号冰川, 酶学特性

Isolation and identification of a *Microbacterium* sp. LW106 strain producing cold-active β -galactosidase, and study on its enzyme production conditions and enzymatic properties

ZHANG Yu-Jie WANG Li-Jun LI Meng GU Yan-Ling GUAN Bo* NI Yong-Qing

The Food College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China

Abstract: 【Background】 Cold-active β -galactosidases are typically characterized by a high lactose hydrolysis activity at low temperature. Such a characteristic makes cold-active β -galactosidase highly attractive for application in low-lactose milk production industry, and how to mine novel cold-active β -galactosidase with enzymatic properties perfectly suitable for lactose hydrolysis in milk solution condition becomes a research focus. 【Objective】 This study is aiming to screen novel strains producing

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31560432); Project of Youth Innovative Talent Cultivation Plan of Shihezi University (CXRC201702)

*Corresponding author: Tel: 86-993-2058735; E-mail: guanbo@shzu.edu.cn

Received: 27-03-2018; Accepted: 27-07-2018; Published online: 14-08-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31560432); 石河子大学青年创新人才培养计划项目(CXRC201702)

*通信作者: Tel: 0993-2058735; E-mail: guanbo@shzu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-27; 接受日期: 2018-07-27; 网络首发日期: 2018-08-14

cold-active β -galactosidase from glacier sediments at China No.1 glacier in Tianshan Mountains and to evaluate if the enzymatic properties of the cold-active β -galactosidase is suitable for further application in low-lactose milk production. **[Methods]** Primary screening using X-Gal culture plate, and secondary screening by assaying the relative β -galactosidase activity at low temperature were carried out. The target strain selected was identified by physiological, biochemical and 16S rRNA gene sequencing. The growth condition and enzyme production condition of the isolate were optimized by single-factor experiment. Enzymatic properties of the partially purified β -galactosidase produced by the isolate were also investigated. **[Results]** LW106, a strain with high β -galactosidase activity, was identified as *Microbacterium* sp. LW106. The optimal temperature for LW106 producing β -galactosidase is 25 °C. Soluble starch was the optimal carbon source for LW106 to produce β -galactosidase, the optimum medium initial pH was 7.0, and the optimal inoculum size was 3%. Preliminary study on its enzymatic properties showed that the optimal pH of the β -galactosidase of strain LW106 was 6.0, and the optimal reaction temperature was 35 °C with a relative activity of 78% at 4 °C. The β -galactosidase produced by LW106 showed the best stability at 4 °C and pH 7.0. Metal ion Na^+ at a level of 10 mmol/L did not inhibit the activity of β -galactosidase of LW106, while 10 mmol/L of Ca^{2+} activated the β -galactosidase activity. **[Conclusion]** The enzymatic properties of β -galactosidase produced by *Microbacterium* sp. LW106 indicated it may be suitable for lactose hydrolysis at low temperature, showing good application potential in low-lactose milk production industry.

Keywords: Cold-active β -D-galactosidase, *Microbacterium*, China No.1 glacier, Enzymatic properties

β -D-半乳糖苷半乳糖水解酶(β -D-galactoside galactohydase EC3.2.1.23)也称 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase), 俗称乳糖酶, 能够催化乳糖水解生成半乳糖和葡萄糖, 部分 β -半乳糖苷酶还具有一定的转糖基活性^[1]。 β -半乳糖苷酶来源广泛, 源自微生物中的 β -半乳糖苷酶产酶量高、成本低, 不受季节、地理位置的限制。因此, 截至目前只有来源于微生物的 β -半乳糖苷酶在工业上具有应用价值^[2]。通过添加 β -半乳糖苷酶分解乳品中的乳糖, 能显著缓解“乳糖不耐症”。浓缩乳和冷冻乳加工过程中使用 β -半乳糖苷酶还可防止乳制品结晶, 提高产品品质。在酸乳生产加工过程中, 低乳糖牛乳发酵能够缩短牛乳凝固时间, 延长货架期, 提高乳制品的黏度^[3]。

低温下水解乳糖不仅可以更好地保留乳品的营养成分和风味, 还可以避免常温水解过程中的微生物污染^[4]。然而, 目前帝斯曼公司(DSM)的 β -半乳糖苷酶来源于乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*), 其最适反应温度为 50 °C, 在低于 20 °C 的低温条件下水解乳糖的效率仅为常温下的 10%左

右^[5]。此外, 现有的商品 β -半乳糖苷酶还存在活性易被 Ca^{2+} 和 Na^+ 所抑制的缺陷^[6], 因此, 筛选适合在牛乳体系中水解乳糖的新低温 β -半乳糖苷酶成为研究的热点^[7-9]。

新疆具有丰富的冰川资源, 境内多达 1.86 万条冰川, 面积约为全国冰川面积的 42%, 是新疆的天然固体水库^[10]。常年低温的气候环境为发现新的具有特殊酶学性质的低温酶提供了可能。本研究对分离自天山一号冰川的一株产低温 β -半乳糖苷酶菌株 LW106 进行了鉴定, 并对其产 β -半乳糖苷酶的条件及其酶学性质进行了初步分析, 以期开发新的酶学特性适合在牛乳体系中高效水解乳糖的低温 β -半乳糖苷酶制剂提供理论基础。

1 材料

1.1 样品采集及预处理

从距乌鲁木齐市西南约 120 km 的乌鲁木齐河源区天山中国一号冰川(43°06'54.05"N, 86°48'40.21"E, 海拔 3 833 m, 年平均地温约-4.95 °C)尾部的沉积层取样。用经过灭菌处理的工具采集冰川沉积层深度约 10 cm 的样品, 立刻装进灭菌离心管内, 车载

冰箱保存并迅速转运至实验室, 去除样品表层可能受到污染的部分, 分装(5 g/份)后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

在超净工作台内, 取 5 g 沉积物样品加入 50 mL 浓度为 0.85% 的无菌生理盐水, 振荡摇匀待用。

1.2 培养基

(1) 1/4 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基(g/L): 大豆肉汤水解物 1.25, 酪蛋白水解物 4.25, 氯化钠 0.63, 葡萄糖 0.75, 磷酸氢二钠 0.63。

(2) 初筛培养基(g/L): 乳糖 5.0, 蛋白胨 0.5, 酵母浸粉 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07, KH_2PO_4 0.1, CaCl_2 0.04, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, 琼脂 15.0, pH 7.0。

(3) 复筛培养基(g/L): 乳糖 10.0, 酵母浸粉 10.0, NaCl 4.0, 胰蛋白胨 5.0, pH 7.0。

(4) 发酵培养基(g/L): 乳糖 10.0, 酵母浸粉 10.0, 胰蛋白胨 5.0, CaCl_2 0.11, KH_2PO_4 0.05, MnSO_4 0.001, MgSO_4 0.3, FeSO_4 0.03, pH 7.0。

(5) 明胶基础培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 牛肉膏 3.0, 明胶 120.0, pH 7.0-7.2。

(6) 硫酸亚铁半固体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉浸粉 3.0, 酵母浸粉 3.0, FeSO_4 0.2, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.3, NaCl 5.0, 琼脂粉 12.0, pH 7.4。

(7) 蛋白胨-酵母膏(PY)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 10.0, CaCl_2 0.008, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, K_2HPO_4 0.04, KH_2PO_4 0.04, NaHCO_3 0.4, NaCl 0.08。

1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨和酵母浸粉购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 邻硝基苯酚(oNP)、邻硝基苯 β -D-半乳糖吡喃糖苷(oNPG)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 扩增仪, Techne 公司; 酶标仪, BioTek 公司。

2 方法

2.1 产 β -半乳糖苷酶菌株的分离筛选

2.1.1 初筛

吸取 1 mL 已振摇的土壤悬液, 加入装有 50 mL 1/4 TSB 培养基的锥形瓶内, 混合均匀, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培

养 48 h 得到增殖培养液。无菌生理盐水梯度稀释 (10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}) 培养液, 每个稀释度吸取 100 μL 悬液均匀涂布到添加有 X-Gal 和 IPTG 的 1/4 TSB 培养基平板上, 置于 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 6-15 d, 当菌落出现蓝白色变化时进行初筛, 挑取蓝色菌落分离纯化 3 次。

2.1.2 复筛

挑取初筛获得的蓝色单菌落接种到 5.0 mL 复筛培养基中, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养, 培养结束后测定菌体密度 OD_{600} 。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 洗涤菌体 2 次后, 加入 100 μL 1% (体积比) 的乙酸乙酯振摇, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h, 再加入 100 μL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 即得 β -半乳糖苷酶粗酶液, 通过测定粗酶液的 β -半乳糖苷酶活力筛选高产 β -半乳糖苷酶的菌株。

2.2 oNP 标准曲线的绘制

以磷酸缓冲液(pH 7.0) 分别稀释配制终浓度为 0.02、0.05、0.10、0.15、0.20、0.40、0.60 $\mu\text{mol/mL}$ 的邻硝基苯酚(oNP) 标准溶液。以 pH 7.0 的磷酸缓冲液为空白, 在波长 420 nm 处测定各浓度 oNP 的吸光值, 绘制得到 OD_{420} 与 oNP 浓度的标准曲线 ($y=1.4105x-0.0037$, $R^2=0.9995$)。

2.3 β -半乳糖苷酶活力的测定

通过邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(oNPG) 法测定粗酶液的 β -半乳糖苷酶活力。在 50 μL oNPG 的磷酸缓冲液(pH 7.0) 中加入 50 μL 粗酶液, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min 或 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后, 吸取 200 μL 在冰箱预冷的 NaCO_3 (0.5 mol/L) 终止反应, 充分混匀后于波长 420 nm 处测定吸光值。为去除溶液的背景吸光值, 以加热灭活的粗酶液与 oNPG 反应的样品作为对照。酶活定义: 1 min 水解 oNPG 生成 1 μmol oNP 所需的酶量定义为 1 个酶活单位。计算酶活 E (U/mL) 的公式为:

$$E = \frac{OD_{420} + 0.0037}{1.4105 \times t} \times 0.3 \times N \times 20$$

式中： OD_{420} ：420 nm 波长处测定的吸光值； N ：粗酶液稀释倍数； t ：粗酶液与底物反应的时间；1.410 5 和 0.003 7：来自 OD_{420} 与 oNP 浓度间的标准曲线回归公式。

2.4 产酶菌株的鉴定

2.4.1 形态观察

对筛选纯化菌株的菌落形态进行观察，然后挑取少许菌体进行革兰氏染色观察。取少量菌体于 1 mL 4% (体积比)戊二醛溶液中固定并进行梯度脱水处理，用扫描电子显微镜进行进一步的细胞形态观察。

2.4.2 生理生化鉴定

参考《伯杰氏细菌鉴定手册》^[11]进行部分生理生化特征鉴定，包括糖发酵试验、明胶水解试验、淀粉水解试验、硫化氢生成试验和运动性试验。

2.4.3 16S rRNA 基因序列分析

采用尿素法提取产酶菌株的基因组 DNA^[10]。以产酶菌株的基因组 DNA 为模板，采用 16S rRNA 基因通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因^[12]。PCR 反应体系：2×*Taq* PCR Master mix 25 μ L，正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L，模板 DNA 1 μ L，ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 40 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，循环 30 次；72 $^{\circ}$ C 10 min。将扩增的 PCR 产物回收后与 pMD19-T 载体连接，转化大肠杆菌 DH5 α 后，提取转化子质粒进行测序。测定出的序列提交 GenBank 数据库用来比对分析。获得相关种属的 16S rRNA 基因序列，在 MEGA 6.0 软件中使用邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树，采用 Bootstrap 法对进化树分支聚类的稳定性进行评价，重复 1 000 次，初步确定产酶菌株的种属分类地位。

2.5 产酶条件研究

2.5.1 培养时间对产酶的影响

将培养好的种子培养液以 2% 的接种量接种到 30 mL 发酵培养基中，20 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡

培养，每隔 6 h 或 12 h 测酶活性及菌体生物量 (OD_{600})，3 个平行实验，重复 2 次，取平均值。

2.5.2 培养温度对产酶的影响

将培养好的种子培养液以 2% 的接种量接种到装有 10 mL 发酵培养基中，分别在 15、20、25 $^{\circ}$ C 条件下 180 r/min 摇瓶培养，每隔 6 h 或 12 h 测定酶活性及菌体生物量(OD_{600})，3 个平行，重复 2 次，取平均值。

2.5.3 碳源对产酶的影响

将乳糖替换为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉，分别加入到培养基中作为碳源，不同碳源的质量浓度与发酵培养基中的乳糖浓度一致。分别接种 2% 的 LW106 菌液于 30 mL 上述发酵培养基中，将摇床条件设为温度 20 $^{\circ}$ C、转速 180 r/min，培养 90 h，记录菌体生物量(OD_{600})和酶活性，每种碳源 3 个平行，重复 2 次，取平均值。

2.5.4 培养基初始 pH 对产酶的影响

分别以醋酸盐缓冲液(HAc-NaAc)、磷酸盐缓冲液($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$)和硼酸盐缓冲液($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O-NaOH}$)配制不同初始 pH 的发酵培养基，使得初始培养基 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5，20 $^{\circ}$ C 培养 90 h，测定不同初始 pH 培养条件下的菌体生物量(OD_{600})和酶活性，每个 pH 条件 3 个平行，重复 2 次。

2.5.5 接种量对产酶的影响

分别以 2%、3%、4%、6%、8%、10% 的接种量接种到 50 mL 的发酵培养基中，20 $^{\circ}$ C 培养 90 h 测酶活。

2.6 酶学性质初步研究

2.6.1 β -半乳糖苷酶的初步纯化

冰浴条件下超声破碎细胞(功率为 125 W，工作 3 s 停 8 s，共 15 min)获得粗酶液。向粗酶液中缓慢加入硫酸铵固体粉末，盐析分离 50%–60%饱和度的沉淀，复溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)，于 14 kD 透析袋中透析过夜，获得初步纯化的 β -半乳糖苷酶。

2.6.2 温度对酶活力的影响

(1) 最适温度。得到的酶液在 4、10、15、20、

25、30、35、40、50、60 °C 分别与底物反应 10 min, 测定 OD_{420} , 每个温度设 3 个平行。以其中最大酶活为 100%, 计算得到相对酶活性。(2) 热稳定性。制得的酶液分别在 4、10、15、20、25、30、35、40、50、60 °C 放置 4 h, 取出后立即冷却, 每个温度设 3 个平行。酶液与底物 30 °C 反应 10 min 后测定 OD_{420} , 以未经处理的酶活为 100%, 计算得到剩余酶活。

2.6.3 pH 对酶活力的影响

(1) pH 对酶活的影响。分别配制不同 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0) 的柠檬酸-磷酸缓冲液, 将酶液分别与上述缓冲液混匀, 30 °C 条件下与底物反应 10 min, 测定 OD_{420} , 不同 pH 做 3 个平行, 将最高点酶活定为 100%, 计算得到相对酶活。(2) pH 对酶稳定性的影响。配制不同 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0) 的缓冲液, 将酶液分别与等量的上述缓冲溶液混合均匀, 30 °C 水浴中保温 3 h, 再加入底物反应 15 min, 测定其 OD_{420} , 每个 pH 设 3 个平行, 并以未经处理时的酶活为 100%, 计算得到剩余酶活。

2.6.4 金属离子对酶活力的影响

在酶反应体系中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Mn^{2+} 金属离子, 每种金属离子设 3 个平行, 以不添加金属离子时的酶活为 100%, 计算得到相对酶活。

3 结果与分析

3.1 菌株的鉴定

3.1.1 菌株的形态特征和生理生化特征

菌株 LW106 培养 5 d 后, 形成 1 mm 至 2 mm 的扁平圆形菌落, 菌落表面光滑, 边缘整齐, 较湿润, 呈浅黄色乳状, 不透明, 革兰氏染色为阳性, 扫描电镜观察显示该菌株细胞形态为不规则短杆状 (图 1)。对菌株 LW106 进行生理生化实验 (表 1) 结果表明, 菌株 LW106 发酵糖类弱产酸, 淀粉水解试验呈阳性, 明胶水解试验显阴性, 硫化氢试验呈阴性, 半固体穿刺培养显示该菌株具有运动能力。

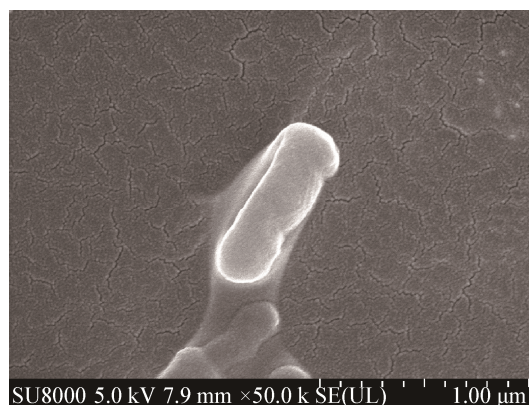


图 1 LW106 菌株细胞的扫描电镜

Figure 1 Scanning electron micrograph of LW106 cell

表 1 菌株 LW106 的部分生理生化特征

Table 1 Partly biochemical and physiological characteristics of the strain LW106

试验项目 Test item	结果 Result
蔗糖发酵 Sucrose fermentation	○
阿拉伯糖发酵 Arabinose fermentation	○
鼠李糖发酵 Rhamnose fermentation	○
甘露糖发酵 Mannose fermentation	○
麦芽糖发酵 Maltose fermentation	○
木糖发酵 Xylose fermentation	○
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	○
半乳糖发酵 Galactose fermentation	○
乳糖发酵 Lactose fermentation	○
明胶水解 Gelatin hydrolysis	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
硫化氢生成 H_2S production	-
运动性 Motility	+

注: ○: 弱产酸; +: 阳性; -: 阴性。

Note: ○: Weak acid production; +: Positive; -: Negative.

3.1.2 菌株 LW106 的 16S rRNA 基因序列分析

对 LW106 菌株的 16S rRNA 基因序列进行扩增, 获得大小约为 1 500 bp 的扩增片段 (GenBank 登录号为 MH064254)。测定的基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行相似性比对, 发现菌株 LW106 的 16S rRNA 基因序列与叶球形微杆菌 (*Microbacterium phyllosphaerae*) P369/06 (99%)、叶球形微杆菌 (*M. phyllosphaerae*) HWG-A23 (99%)、叶球形微杆菌 (*M. phyllosphaerae*) IHBB 11136 (99%) 的 16S rRNA 基因序列相似性最高。系统进化分析 (图 2) 显示 LW106 与 *M. phyllosphaerae* IHBB 11136、

M. phyllosphaerae HWG-A23 及微杆菌(*Microbacterium* sp.) W21 菌株以 60%的支持率聚成一簇。因此,初步将菌株 LW106 鉴定为微杆菌 *Microbacterium* sp. LW106。

3.2 菌株产酶条件的研究

3.2.1 培养时间和温度对生长及产酶的影响

LW106 菌株在 15、20、25 °C 培养的生长曲线和产酶曲线如图 3 所示。菌株 LW106 在 20 °C 培养

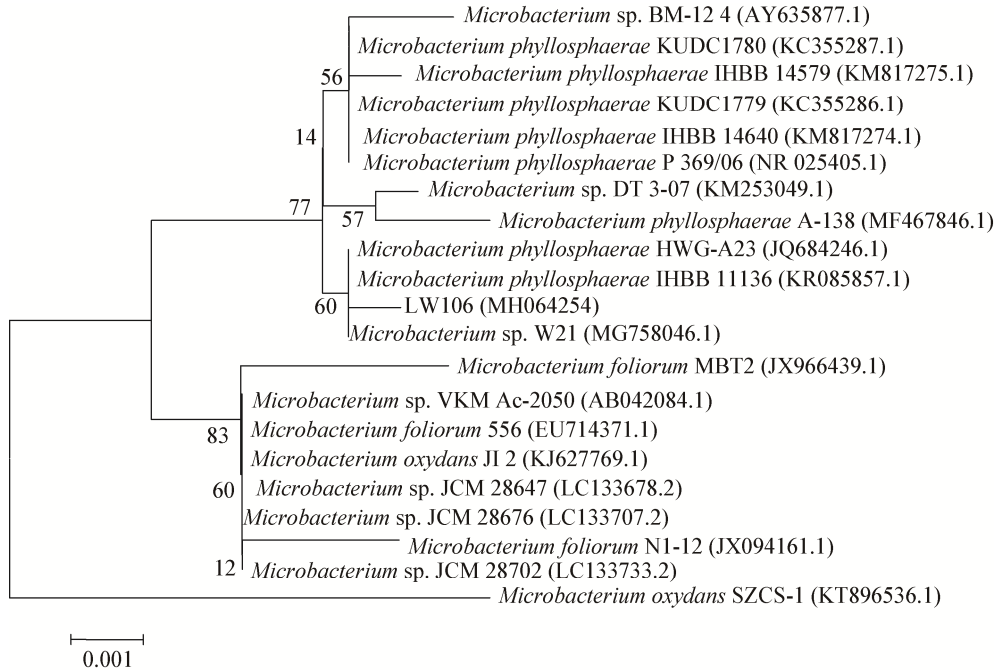


图 2 菌株 LW106 的系统进化分析

Figure 2 Phylogenetic tree of strain LW106

注: 括号中序号为参照菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字表示置信度; 比例尺表示碱基替换率, 0.001 表示 0.1%的替换率^[13]。

Note: The sequence numbers in parentheses correspond to the GenBank accession numbers of the reference strains; The numbers at branch points represent confidence level; The bar scale indicates the rate of substitution per base, 0.001 represents a replacement rate of 0.1%.

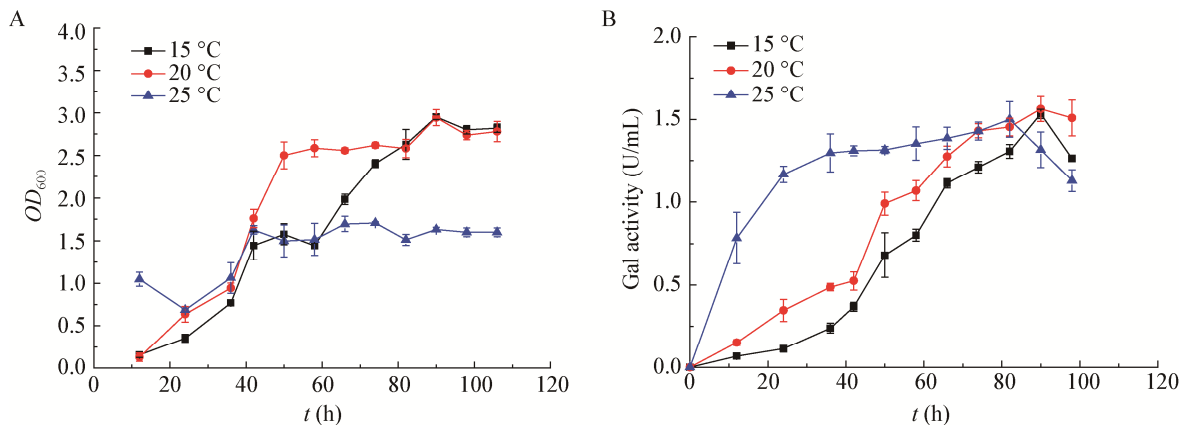


图 3 培养时间和温度对菌株 LW106 生长(A)及产酶(B)的影响

Figure 3 Effects of culture time on LW106 growth (A) and β -galactosidase production (B)

时, 其菌体浓度增长最快, 但在 25 °C 培养时, 产酶水平增长最快, 最高可达 1.499 ± 0.107 U/mL, 因此可选择 25 °C 作为菌株 LW106 的最适产酶温度。

3.2.2 培养基初始 pH 对产酶的影响

不同培养基初始 pH 对菌株 LW106 产酶的影响如图 4 所示, 培养基初始 pH 7.0 对菌株 LW106 产 β -半乳糖苷酶最有利。

3.2.3 碳源对产酶的影响

以 1% (质量体积比) 的比例分别添加乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉, 作为培养基的唯一碳源, 摇瓶发酵培养 90 h 后菌株 LW106 产 β -半乳糖苷酶的结果如图 5 所示, 可溶性淀粉为菌株

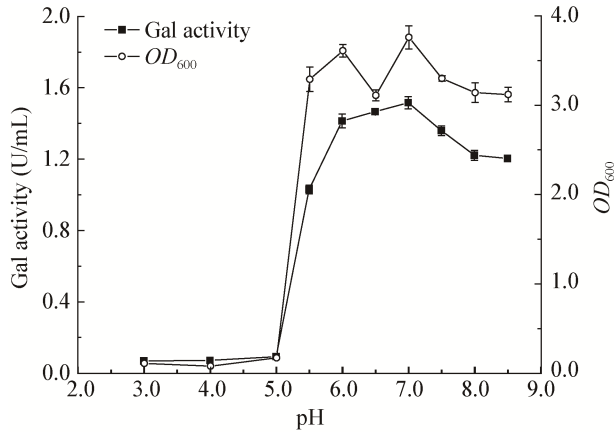


图 4 培养基初始 pH 对产酶的影响

Figure 4 Effect of initial pH on production of β -galactosidase from LW106

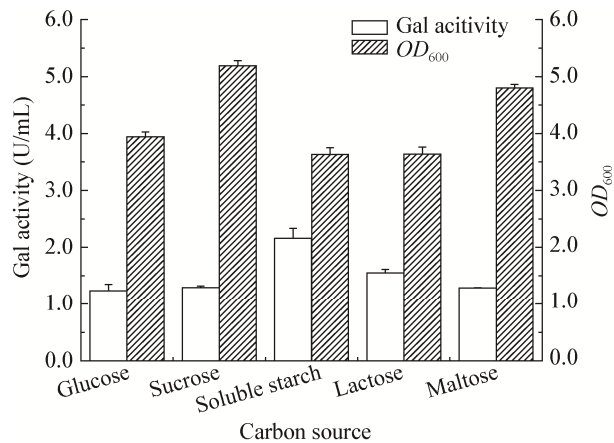


图 5 不同碳源对 LW106 产酶的影响

Figure 5 Effect of carbon source on β -galactosidase production of LW106

LW106 产酶的最适碳源, 说明菌株 LW106 能够较好地水解利用可溶性淀粉产 β -半乳糖苷酶。

3.2.4 接种量对产酶的影响

培养基成分及发酵条件不变, 将接种量分别设为 2%、3%、4%、6%、8%、10%, 测定接种量对菌株产 β -半乳糖苷酶的影响(图 6)。当接种量为 3% 时, 菌株产 β -半乳糖苷酶的活力最高, 达到 2.208 ± 0.043 U/mL。

3.3 酶学特性的初步研究

3.3.1 酶的最适温度及热稳定性

菌株 LW106 所产 β -半乳糖苷酶的最适作用温度在 35 °C 左右(图 7), 4 °C 下相对酶活约为 78%。

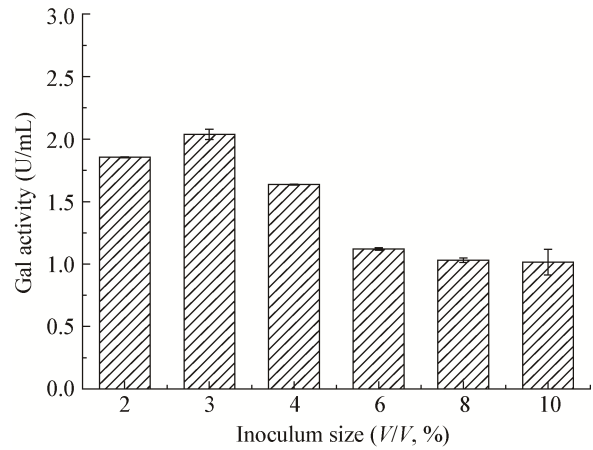


图 6 接种量对 LW106 产酶的影响

Figure 6 Effect of inoculation amount on production of β -galactosidase from LW106

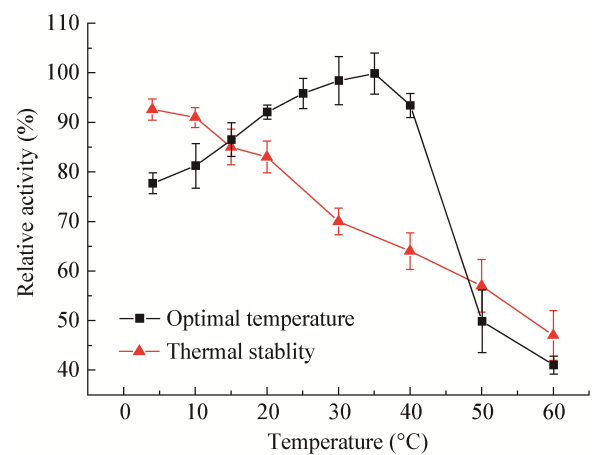


图 7 酶的最适温度及热稳定性

Figure 7 The optimal temperature and thermal stability of β -galactosidase from LW106

低温下该酶的稳定性较好, 4 °C 条件下保温 4 h, 剩余酶活约 93%。随着温度的升高, 酶的稳定性下降, 60 °C 保温 4 h, 剩余酶活仅约 47%。

3.3.2 酶的最适 pH 及 pH 稳定性

在 pH 6.0 左右, 菌株所产 β -半乳糖苷酶具有最高酶活(图 8), 在 pH 5.0–7.0 之间能保持较高酶活。在 pH 为 7.0 时, 该酶 4 °C 保温 4 h 的剩余酶活最高; 当保存 pH 低于 6.0 或高于 8.0 时, 酶的稳定性明显降低。

3.3.3 金属离子对 LW106 所产 β -半乳糖苷酶活性的影响

不同金属离子对菌株 LW106 所产 β -半乳糖苷酶酶活的影响结果如图 9 所示。10 mmol/L 的 Cu^{2+}

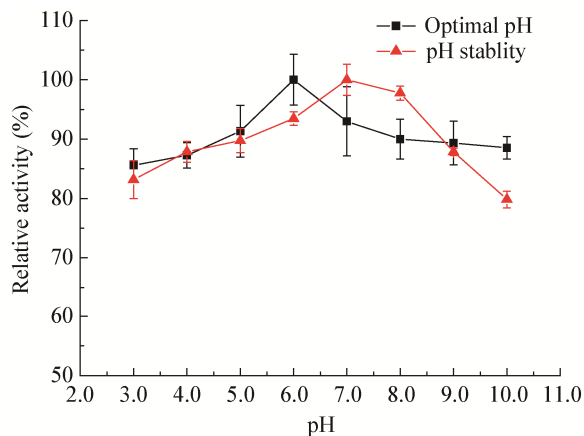


图 8 酶的最适 pH 及 pH 稳定性

Figure 8 The optimal pH and pH stability of β -galactosidase from LW106

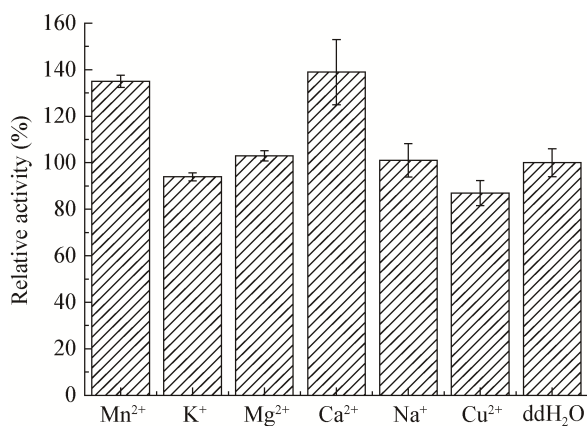


图 9 金属离子对酶活的影响

Figure 9 Effects of metal ions on the β -galactosidase activity

对酶活性有弱抑制作用, Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 对酶活性无明显影响, Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对菌株 LW106 所产 β -半乳糖苷酶有一定的激活作用。

4 讨论与结论

本研究从天山一号冰川中筛选出一株低温 β -半乳糖苷酶产生菌, 对其进行形态学、生理生化和 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定为微杆菌 *Microbacterium* sp. LW106。截至本文投稿前, 来源于微杆菌属 (*Microbacterium*) 菌株低温 β -半乳糖苷酶的报道应属首次^[14], 已有的相关文献报道的产生低温 β -半乳糖苷酶的菌株主要是节杆菌属 (*Arthrobacter*) 和假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 菌株^[6,15-18]。近年来也有从拉恩氏菌属 (*Rahnella*)^[4,19]、沙雷氏菌属 (*Serratia*)^[20] 及海单胞菌属 (*Marinomonas*)^[21] 分离产低温 β -半乳糖苷酶菌株的报道, 但产酶水平普遍较低 (1–3 U/mL)。对菌株 LW106 产酶条件的研究表明, 该菌的最适产酶温度为 25 °C, 最佳碳源为可溶性淀粉, 最适初始 pH 为 7.0, 最佳接种量为 3%, 最佳产酶条件下的产酶量可达 2.208 ± 0.043 U/mL。

不同来源的 β -半乳糖苷酶酶学特性存在较大差异, 来源于低温微生物中的 β -半乳糖苷酶并不一定是低温 β -半乳糖苷酶。分离自日本北海道土壤中的嗜冷乳糖节杆菌 (*Arthrobacter psychrolactophilus*) F1、F2、F3、F4 和 F5 菌株所产 β -半乳糖苷酶的最适温度为 10 °C, 在 0 °C 仍能保留 80% 的酶活, 其中菌株 F1、F3 和 F5 中还存在一个最适反应温度为 30 °C 的 β -半乳糖苷酶同功酶^[9]。从新疆天山冻土中分离的拉恩氏菌 (*Rahnella* sp.) R3 菌株所产的胞内低温半乳糖苷酶最适反应温度为 45 °C, 温度为 15 °C 时的酶活为最高酶活的 40%, 4 °C 时的酶活仅为最高酶活的 23%^[20]; 从低温微生物中获得的低温 β -半乳糖苷酶的最适作用温度通常在 25–35 °C, 最适 pH 为 6.0–8.0^[21-23]。本研究中菌株 LW106 所产低温 β -半乳糖苷酶的最适反应温度为 35 °C, 4 °C 时相对酶活约为 78%, 表明具有较好的低温适应性。与已报道的其他低温 β -半乳糖苷酶不同, 以 oNPG 为底物时, Na^+ 对该菌株所产低温 β -半乳糖苷

酶的酶活性基本没有抑制作用, Ca^{2+} 对该酶活性还具有一定的激活作用。鲜牛乳的pH在6.0–7.0左右, 而且牛乳中含有金属离子 Na^+ 和 Ca^{2+} [24], 因此, 有必要对菌株 LW106 所产低温 β -半乳糖苷酶以乳糖为底物的酶学特性, 以及在低温牛乳体系中水解乳糖的特性进行进一步的分析。

REFERENCES

- [1] Zhang SZ. Enzyme Preparation Industry[M]. Beijing: Science Press, 1984: 655-670 (in Chinese)
张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 655-670
- [2] Li YQ. Studies on β -galactosidase produced by filamentous fungus[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin Institute of Light Industry, 2000 (in Chinese)
李玉强. 丝状真菌 β -半乳糖苷酶的研究[D]. 天津: 天津轻工业学院硕士学位论文, 2000
- [3] Qin Y, Ning ZX, Hu XY. Advance of application and research in β -galactosidase[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2000, 31(6): 595-599 (in Chinese)
秦燕, 宁正祥, 胡新宇. β -半乳糖苷酶的应用研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(6): 595-599
- [4] Shen LL. Screening and mutation breeding of a strain producing cold-adapted lactase and the study on optimization of fermentation conditions and its crude enzymatic properties[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)
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: 江南大学硕士学位论文, 2013
- [5] Karasová P, Spiwok V, Malá Š, et al. β -galactosidase activity in psychrotrophic microorganisms and their potential use in food industry[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2002, 20(2): 43-47
- [6] Cieśliński H, Kur J, Białkowska A, et al. Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted beta-galactosidase from antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 39(1): 27-34
- [7] Ghosh M, Pulicherla KK, Rekha VPB, et al. Cold active β -galactosidase from *Thalassospira* sp. 3SC-21 to use in milk lactose hydrolysis: a novel source from deep waters of Bay-of-Bengal[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(9): 2859-2869
- [8] Alikunju AP, Sainjan N, Silvester R, et al. Screening and characterization of cold-active β -galactosidase producing psychrotrophic *Enterobacter ludwigii* from the sediments of Arctic Fjord[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 180(3): 477-490
- [9] Nakagawa T, Fujimoto Y, Uchino M, et al. Isolation and characterization of psychrophiles producing cold-active β -galactosidase[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 37(2): 154-157
- [10] Zhang M, Gu YL, Xu YL, et al. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing β -galactosidase from permafrost sediments of the bottom layer of the Glacier No.1 in the Tianshan Mountains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(12): 1605-1615 (in Chinese)
张明, 顾燕玲, 徐宇丽, 等. 天山 1 号冰川底部沉积层产 β -半乳糖苷酶低温菌株的系统发育分析及生理多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1605-1615
- [11] Buchana RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 382-533 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 382-533
- [12] Li DY, Shang A, Zhang D, et al. Screening of a glycolipid biosurfactant-producing strain for kerogen biodegradation[J]. Microbiology China, 2017, 44(11): 2606-2614 (in Chinese)
李德雨, 商奥, 张迪, 等. 一株脂糖表面活性剂产生菌的筛选及干酪根降解[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2606-2614
- [13] Guan B, Zhang X, Hu YC, et al. Isolation and identification of pathogenic fungi in rotten sweet cherry from Shihezi, Xinjiang[J]. Microbiology China, 2018, 45(11): 2480-2487 (in Chinese)
关波, 张璇, 胡玉婵, 等. 新疆石河子地区甜樱桃采后腐烂致病真菌的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2018, 45(11): 2480-2487
- [14] Zhang YJ. Isolation and identification of a *Microbacterium* sp. LW106 strain producing cold-active β -galactosidase and its enzymatic properties[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2018 (in Chinese)
张宇洁. 一株产低温 β -半乳糖苷酶菌株 *Microbacterium* sp. LW106 的筛选鉴定、产酶条件及其酶学特性[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2018
- [15] Coker JA, Sheridan PP, Loveland-Curtze J, et al. Biochemical characterization of a β -galactosidase with a low temperature optimum obtained from an Antarctic *Arthrobacter* isolate[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(18): 5473-5482
- [16] Hoyoux A, Jennes I, Dubois P, et al. Cold-adapted β -galactosidase from the antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1529-1535
- [17] Pawlak-Szukalska A, Wanarska M, Popinigis AT, et al. A novel cold-active β -D-galactosidase with transglycosylation activity from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32cB – Gene cloning, purification and characterization[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(12): 2122-2133
- [18] Turkiewicz M, Kur J, Białkowska A, et al. Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b as a source of cold-adapted β -Galactosidase[J]. Biomolecular Engineering, 2003, 20(4/6): 317-324
- [19] Fan YT, Hua X, Zhang YZ, et al. Cloning, expression and structural stability of a cold-adapted β -galactosidase from *Rahnella* sp. R3[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 115: 158-164
- [20] Zhang X, Hua X, Xu Q, et al. Purification and characterization of a novel cold-adapted β -galactosidase[J]. Food & Machinery, 2014, 30(3): 174-178 (in Chinese)
张雪, 华霄, 许琪, 等. 低温 β -半乳糖苷酶分离纯化及酶学性质研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 174-178
- [21] Wang GX, Gao Y, Hu B, et al. A novel cold-adapted β -galactosidase isolated from *Halomonas* sp. S62: gene cloning, purification and enzymatic characterization[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(8): 1473-1480
- [22] Zhou CL, Yu Y, Li HR, 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, 22(1): 48-55 (in Chinese)
周春雷, 俞勇, 李会荣, 等. 低温 β -半乳糖苷酶产生菌的筛选、鉴定、生长特性及酶学性质的初步研究[J]. 极地研究, 2010, 22(1): 48-55
- [23] Zhang B. Screening of psychrotolerant bacterium producing cold-active β -galactosidase and optimization for producing conditions of β -galactosidase[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong Pharmaceutical University, 2011 (in Chinese)
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]. 广州: 广东药学院硕士学位论文, 2011
- [24] Zeng Q, Wang YS, Sun K, et al. Preliminary studies on the screening, identification and optimum fermentative conditions of a strain *Marinomonas* sp. BSi20414 isolated from arctic sea ice producing β -galactosidase[J]. Chinese Journal of Polar Research, 2011, 23(2): 108-114 (in Chinese)
曾倩, 王毓舒, 孙颀, 等. 一株分离自北极海冰的产 β -半乳糖苷酶的海单胞菌(*Marinomonas* sp. BSi20414)的筛选、鉴定和产酶条件研究[J]. 极地研究, 2011, 23(2): 108-114