

# 用于低乳糖牛奶生产的乳糖酶添加剂候选 菌株筛选及粗酶性质研究

李 荷\*, 张 博, 张敏文, 顾取良

(广东药学院 生物化学与分子生物学系, 广东 广州 510006)

**摘要:** 在低乳糖牛奶加工过程中需要高活性的低温乳糖酶作为添加剂。为此, 从采集土样中分离纯化获得 1 株低乳糖奶加工过程中需要的高乳糖酶活性候选菌株, 应用形态学和分子生物学方法, 初步鉴定该菌株为动球菌属(*Planococcus* sp.), 命名为 *Planococcus* sp. Y。研究表明, 该菌株是 1 株低温菌株, 其最适生长温度为 25℃, 最佳生长 pH 值为 7.0, 所产酶为胞内酶, 粗酶液的最适酸碱度和温度分别为 pH 7.0 和 25℃。

**关键词:** 乳糖酶; 筛选; 低温菌

中图分类号: S879.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)04-0138-05

## Screening of A Psychrotolerant Bacterium of *Planococcus* sp. Y Producing Low Temperature Lactose and Preliminary Study on Its Enzyme Activity

LI He\*, ZHANG Bo, ZHANG Min-wen, GU Qu-liang

(Department of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** High activity of cold-adapted low lactase as an additive is necessary in processing low lactose milk. The psychrotrophic and bacterium strain was isolated from surficial soils. A strain capable of producing psychrotrophic a lactase was identified as a *Planococcus* sp. Y according to the morphological and molecular characteristics. The optimal conditions for the growth of the strain were examined. The optimal temperature and pH value for growth were 25℃ and 7.0, respectively. Study on the activity of the lactase showed that the optimal temperature and pH for the activity of the crude enzyme was 25℃ and 7.0, respectively. The lactase from *Planococcus* sp. Y was located intracellularly. This will provide a foundation for producing low lactose milk in future.

**Key words:** Lactase; Screening; Psychrotolerant bacterium

在畜牧业奶制品及其副产品生产及加工过程中, 存在着生产所用的常温乳糖酶在低温下酶活力很低, 成本高, 难以满足市场及生产所需的问题<sup>[1]</sup>。为解决此问题, 国外的研究者首先致力于产低温乳糖酶(乳糖酶又名  $\beta$ -半乳糖苷酶)菌株的分离筛选<sup>[2-3]</sup>。国内外对低温乳糖酶的研究是从近十几年

才开始, 而且尚处于实验室研究阶段<sup>[6-10]</sup>。但目前常用的乳糖酶其最适反应温度大多较高, 对 pH 的要求比较严格, 其生产成本相对较高, 消耗较多的能源。因此, 寻找一种在较低温度和较大 pH 范围下具有高活性的乳糖酶, 对于降低成本、节约能源, 具有重要的应用价值。本研究采集土样作为获取菌株

收稿日期: 2010-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570055); 广东省科技计划项目(2009B020313005); 广东省自然科学基金博士启动基金(9451022401003873); 广东药学院博士启动项目(2006JCX06)

作者简介: 李 荷(1968-), 女, 黑龙江绥化人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事微生物分子生物学的研究。\* 为通讯作者。

E-mail: lihe32@163.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的来源,先在低温条件下进行分离、筛选,然后再以 ONPG 为底物测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活力,获取 1 株具有高  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的低温菌株,通过对菌株形态的研究和 16S rDNA 分析,对菌株进行初步鉴定,为进一步研究优质低乳糖奶的生产工艺提供条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

试验用土样采集自小兴安岭。Taq DNA 聚合酶与各种限制性内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司,胶回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司,PCR 引物由上海博亚公司合成。pGEM-T-Easy 购自 Promega 公司。对硝基苯酚(Sigma 公司),ONPG (Sigma 公司),胰蛋白胨、酵母抽提物购自 Oxoid 公司,其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 主要溶液及培养基

溶液的配制:碳酸钠溶液(0.5 mol/L),磷酸二氢钾-柠檬酸缓冲液 pH(2.5~6.0);磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(PBS)pH(6.0~8.0);Tris-HCl 缓冲液: pH(7.5~9.0);甘氨酸-氢氧化钠缓冲液: pH(8.5~10.0);广泛缓冲液: pH(11.0~12.0)pNPG 溶液(10 mmol/L);对硝基苯酚标准储备液(10 mmol/L);对硝基苯酚标准工作液。

### 1.3 试验方法

1.3.1 低温菌的富集和分离 在采集土样区,取表土层下不同深度的土样,然后将土样配制成悬浮液,接种到培养基中,振荡培养。待菌长出后,将所得的菌液稀释成不同浓度,涂布在固体培养基上,倒置在 4℃冰箱培养;当平板出现菌落时,将单菌落在平板上划线分离、纯化菌株。将生长快、菌落规则、传代稳定的单菌落斜面保存;斜面单菌落接入液体培养基,振荡培养 2 d,以 ONPG 为底物测定乳糖酶的活力。

1.3.2 乳糖酶活力测定程序 将培养液离心,弃上清,加入 0.2 mol/L pH 9.0 的醋酸钠缓冲液,用超声破碎,然后将破碎后的菌体,离心,将上清移入试管,放入冰箱;取上清,加入 0.25% ONPG (0.2 mol/L pH 9.0 醋酸钠缓冲液配制),30℃水浴 30 min,加入 2 mL 1 mol/L 碳酸钠显色液,测定乳糖酶活性,同时以 0.2 mol/L pH 9.0 醋酸钠缓冲液代替上清作为对照;计算水解产物邻硝基酚(ONP)的含量和酶活性。

1.3.3 产高  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的低温菌株的分离和筛选 采集土样,经富集培养,将样品稀释后涂布于选择性培养基平板上进行分离,并放在 4℃冰箱

培养,选择平板上共筛选到 10 株细菌,将 10 株细菌接种于液体选择性培养基中 25℃培养 24 h 后,进行乳糖酶活性的测定,其中菌株 Y 具有较高的酶活性,其他均无乳糖酶活性。

1.3.4 细菌的鉴定 形态学鉴定根据形态观察和鉴定手册进行。分子生物学鉴定提取需要鉴定菌种的 DNA,以其为模板,利用细菌保守的间隔序列的通用引物进行 PCR 扩增,纯化后连接载体或直接测序。

1.3.5 产高  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的低温菌株的生长条件的研究

1.3.5.1 菌株 *Planococcus* sp. Y 生长曲线的测定 对菌株 Y 进行活化,接入装有 25 mL 培养基的三角瓶中,25℃振荡培养 12 h,以 2%的接种量接入装有 50 mL 培养基三角瓶中,3 次重复,相同条件下培养,在波长 600 nm 处测定 OD 值,开始每隔 1 h 测 1 次,5 h 后每隔 2 h 测 1 次,记录数据。

1.3.5.2 不同碳源和氮源对菌株 *Planococcus* sp. Y 生长和产酶性能的影响 在装有无机盐培养基的三角瓶中,接种,分别添加已灭菌的葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、乳糖、麦芽糖溶液、蛋白胨、牛肉膏、尿素、酵母粉,同时做无碳氮源对照和空白对照。每个处理 3 个重复,取平均值作为结果。在 25℃,振荡培养 2 d 后,分别取样 10 mL 测定菌体的生长量和乳糖酶活性,确定对菌株的生长和产酶性能有较大影响的营养物质。

1.3.5.3 温度对菌株 *Planococcus* sp. Y 生长的影响 按种子培养液 2%的接种量接种于培养基中,在不同温度下(4、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70℃)培养 2 d 后,分别取样 10 mL 测定菌体生长量,确定对菌株的生长有较大影响的温度。每个处理 3 个重复。

1.3.5.4 pH 对菌株 *Planococcus* sp. Y 生长的影响 测定培养基 pH 值在 2.0~12.0 之间时对菌株 Y 生长的影响。每个处理 3 个重复,25℃下振荡培养 2 d 后,取样 10 mL 测定菌体生长量。

1.3.6 酶的定位和粗酶液理化性质的研究

1.3.6.1 酶的定位 取活化过的菌株接种于培养基,25℃下培养 2 d 后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,边搅拌边加研磨好的硫酸铵至饱和度为 80%,4℃透析过夜,12 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀。用 pH 6.2、0.02 mol/L 的磷酸缓冲液溶解后,再用同一缓冲液透析得即得胞外粗酶液。把离心沉淀下来的菌体用 pH 6.2、0.02 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤 3 次。然后将离心沉下来的菌体配成菌悬

液, 超声破碎, 离心, 取上清液, 即得胞内粗酶液。

1.3.6.2 酶的最适反应 pH 值 将酶液分别加入到上述 pH 2.0~12.0 的缓冲液中, 按标准方法测定酶活力, 以酶活性最高者定为 100%, 以相对活力和所对应的 pH 值作图。

1.3.6.3 酶的 pH 稳定性 将酶液分别加入到 pH 2.0~12.0 缓冲液中, 30℃保温 1 h 后, 按标准酶活力测定方法测定残余酶活力, 以在最适反应 pH 下测得的酶活力定为 100%。以相对活力和所对应的 pH 值作图。

1.3.6.4 酶的最适反应温度 将酶液和 pH 9.0 的 0.05 mol/L 甘氨酸—氢氧化钠缓冲液分别在 4、10、20、25、30、35、40、45、50、60、70℃的水浴中保温 30 min, 然后加入底物溶液, 按照标准方法测定酶活力, 得到酶液在不同的反应温度下所具有的酶活力, 以酶活力最高者定为 100%, 以相对活力对温度作图。

1.3.6.5 酶的热稳定性 酶液分别在 4、10、20、25、30、35、40、45、50、60、70℃的水浴中保温 2 h 后, 然后加入底物溶液, 按照标准方法测定残余酶活力, 以未处理酶液的酶活力定为 100%, 以相对活力对保温时间作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 产低温β-半乳糖苷酶菌种的分离

采集土样, 经富集培养, 将样品稀释后涂布于培养基平板上进行分离, 并放在 4℃冰箱培养, 在选择培养基上共筛选到 10 株细菌。将这 10 株细菌分别接种于液体选择性培养基中 25℃培养 24 h 后, 进行乳糖酶活性的测定, 其中菌株 Y 酶活性较高, 其他均无乳糖酶活性。

### 2.2 菌株形态特征及分子鉴定

分离株 Y 呈球状, 单个或短链状排列。红色, 革兰氏阳性。25℃培养 12 h 的菌落形态, 呈球形, 半透明, 湿润, 表面光滑。在核酸水平上, 分离株的 16S rDNA 与 GenBank 中的 *Planococcus* sp. 登录的 16S rDNA 有 99% 的一致性。根据以上形态特征, 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)<sup>[10]</sup> 以及 16S rDNA 序列同源性比较结果, 将分离株归为动球菌属 *Planococcus* sp., 命名为 *Planococcus* sp. Y。

### 2.3 菌株 *Planococcus* sp. Y 的生长曲线测定

从图 1 可知, 菌株 Y 从开始接种到生长 4.5 h 处于延滞期; 从 4.5 h 到 12 h 为指数生长期, 代谢旺盛。从 12~16 h 细胞的生长处于稳定期。16 h 后细胞的生长处于衰亡期。

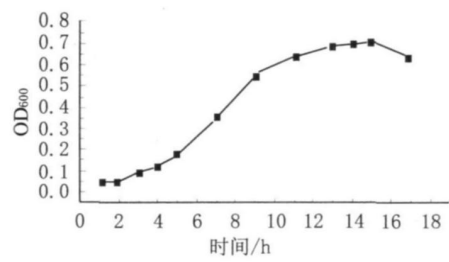


图 1 菌株 *Planococcus* sp. Y 的生长曲线

### 2.4 不同碳源对菌株 *Planococcus* sp. Y 的生长和产酶性能的影响

当乳糖作为碳源时, 菌株 *Planococcus* sp. Y 生长最快, 乳糖酶活力最高; 可溶性淀粉做碳源时, 菌株 *Planococcus* sp. Y 的酶活力次之(表 1)。

表 1 碳源对菌株 *Planococcus* sp. Y 产酶性能的影响

碳源	酶活力/(U/mL)
麦芽糖	5.483
蔗糖	5.681
可溶性淀粉	16.426
乳糖	28.562
无碳源对照	15.332
葡萄糖	2.365

### 2.5 氮源对菌株 *Planococcus* sp. Y 产酶性能的影响

无机培养基中添加蛋白胨、牛肉膏、酵母粉时, 都不同程度地提高了酶活性, 但添加尿素时, 所测得的酶活性降低(表 2)。

表 2 氮源对菌株 *Planococcus* sp. Y 产酶性能的影响

氮源	酶活力/(U/mL)
蛋白胨	13.168
牛肉膏	29.463
尿素	1.853
酵母粉	37.689
无氮源对照	5.560

### 2.6 温度对菌株 *Planococcus* sp. Y 生长的影响

由图 2 可知, 在 4~35℃之间, 菌株 *Planococcus* sp. Y 生长良好, 其中适宜温度是 25℃。在 45℃以上时, 菌体生长较慢, 当温度到达 50℃以上难以生长, 说明该菌株在低温下能够活跃生长及代谢。

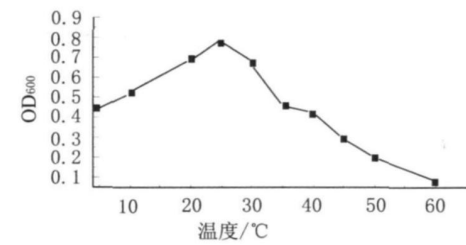


图 2 温度对菌株 *Planococcus* sp. Y 生长的影响

2.7 pH 对菌株 *Planococcus* sp. Y 的生长的影响

pH 低于 4.0, 菌体生长缓慢; 从 pH6.0 开始, 随着 pH 的升高, 菌体 Y 的生长量迅速升高; pH 为 7.0 时, Y 菌株生长最为旺盛; 说明菌株的最适生长 pH 为 7.0(图 3)。

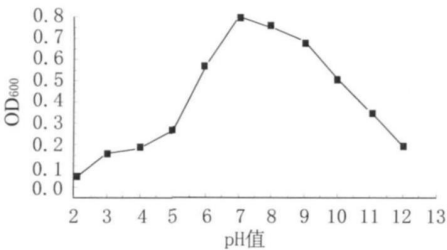


图 3 pH 对菌株 *Planococcus* sp. Y 生长的影响

2.8 酶活性的定位

$\beta$ -半乳糖苷酶活性组分的定位是通过收集完整细胞、破碎细胞, 然后分别测定细胞和上清的酶活力确定的。以完整细胞的酶活力为 100%, 计算各组分的相对活力。结果表明(表 3), 培养液上清中酶相对活力为 0, 说明菌株 *Planococcus* sp. Y 产生的  $\beta$ -半乳糖苷酶位于细胞内。

表 3 细胞不同组分中酶相对活力

组分	酶相对活力/ %
培养上清液	0
完整细胞	100
菌体破碎后沉淀	14
菌体破碎后上清	85

2.9 pH 对酶活性和稳定性的影响

该酶的最适反应 pH 值是 7.0, 在 pH7.0、30℃ 条件下反应 1h 后, 酶活力仍保持在 80% 以上, 酶在中性环境下较为稳定, 结果见图 4。

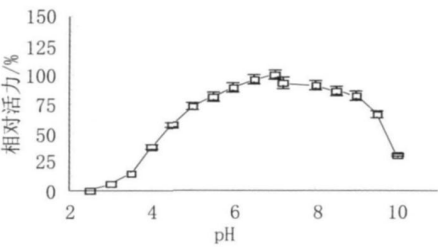


图 4 pH 值对 *Planococcus* sp. Y 的乳糖酶活性和稳定性的影响

2.10 温度对酶活性和热稳定性的影响

研究结果表明(图 5), 低温菌 Y 的乳糖酶的最适反应温度是 25℃, 在低温(0~25℃)下仍具有高活性, 随着温度的升高酶活力急剧降低。50℃保温 1h 后, 酶活性剩余 50%, 70℃保温 1h 后, 酶活性几乎完全丧失, 说明该酶在低温下稳定, 高温(50℃以上)下急剧失活。

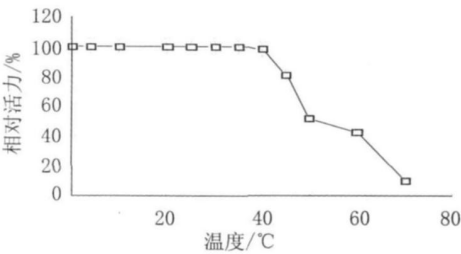


图 5 温度对 *Planococcus* sp. Y 的乳糖酶活性和稳定性的影响

3 结论与讨论

低乳糖牛奶加工以及相关乳制品需要在低温条件下添加具有高活性的乳糖酶。目前, 低温生产所用的常温乳糖酶的酶活力都很低而且成本较高, 难以满足市场及生产所需。低温乳糖酶在兼备高乳糖水解水平的同时能缩短水解时间, 减少细菌污染的风险, 因此应首先着手于对低温乳糖酶菌株的分离筛选。本研究从所采土样中筛选到 1 株产耐低温乳糖酶的低温菌, 并对其酶学性质进行了研究。研究结果表明, 该酶具有较宽的 pH 适应范围(pH6.0~8.0)。对粗酶液的酶活性及耐受性的研究发现, 酶的最适反应温度、最适 pH 均与该菌的最适生长条件一致, 即 25℃、pH7.0, 属于耐低温酶。如果获得该酶纯酶后, 在牛奶加工过程中的低温状态下添加乳糖酶, 降低其乳糖含量, 既可以节约能源又可以达到生产目的。因此, 应进一步进行该酶的分离纯化和提取工艺的研究, 为低温乳糖酶的应用开发打下基础。

参考文献:

[1] Nakagawa T, Fujimoto Y, Uchino M, *et al.* Isolation and characterization of psychophiles producing cold-active beta-galactosidase[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 37: 154-157.

[2] Fernandes S, Geueke B, Delgado O, *et al.* Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium; purification, characterization and application for lactose hydrolysis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58: 313-321.

[3] Coker J A, Sheridan P P, Loveland-Curtze J, *et al.* Biochemical characterization of a beta-galactosidase with a low temperature optimum obtained from an antarctic arthrobacter isolatd [J]. *Bacteriol*, 2003, 185: 5473-5482.

[4] Karasova-Lipovova P, Strnad H, Spiwok V, *et al.* The cloning, purification and characterisation of a cold-active  $\beta$ -galactosidase from the psychrotolerant Antarctic bacterium *Arthrobacter* sp.[J]. (下转至第 145 页)

- fensins in immunity: more than just microbicidal[ J]. Trends Immunol, 2002, 23(6): 291-296.
- [ 7] Stolzenberg E D, Anderson G M, Ackermann M R, *et al.* Epithelial antibiotic induced in states of disease[ J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(16): 8686-8690.
- [ 8] Zhang G, Ross C R, Dritz S S, *et al.* Salmonella infection increases porcine antibacterial peptide concentrations in serum[ J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4(6): 774-777.
- [ 9] O'Neil D A, Porter E M, Elewaut D, *et al.* Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium[ J]. J Immunol, 1999, 163(12): 6718-6724.
- [ 10] Wilson C L, Ouellette A J, Satchell D P, *et al.* Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense[ J]. Science, 1999, 286: 113.
- [ 11] Scott M G, Rosenberger C M, Gold M R, *et al.* An  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage response to LPS and directly alters macrophage gene expression[ J]. J Immunol, 2000, 165: 3358-3365.
- [ 12] Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, *et al.* The endothelin system in septic and endotoxin shock[ J]. Eur J Pharmacol, 2000, 407: 1-15.
- [ 13] Hancock R E W, Scott M G. The role of antimicrobial peptides in animal defences[ J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000, 97: 8856-8861.
- [ 14] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学[ M]. 2版. 长春: 吉林科技出版社, 2001: 518-520.
- [ 15] Alison M R. Regulation of hepatic growth[ J]. Physiol Rev, 1986, 66(3): 499.
- [ 16] 尹学含. 免疫学和免疫学检验试验指导[ M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [ 17] 胡福良, 舒琦艳. 工蜂胎对小鼠非特异性免疫功能的影响[ J]. 蜜蜂杂志, 2004(4): 3-4.
- [ 18] 毕英华, 龚非力. 医学免疫学[ M]. 2版. 北京: 人民军医出版社, 1999: 85-87.
- [ 19] Syrijala H, Surcel H M, Ilonen J. Low CD4/CD8 lymphocyteratio in acute myocardial infection[ J]. Clin Exp Immunol, 1991, 83: 3-26.
- [ 20] Tomasinsig L, Zanetti M. The cathelicidins-structure, function and evolution[ J]. Current Protein and Peptide Science, 2005, 6: 23-34.
- [ 21] Haryadi S, Pak-Lam Yu. Identification of three ostricacins: an update on the phylogenetic perspective of  $\beta$ -defensins[ J]. Antimicrobial Agents, 2006, 27: 235-239.
- (上接第 141 页)
- Enzyme Microb Technol, 2003, 33: 836-844.
- [ 5] Turkiewicz M, Kur J, Bialkowska A, *et al.* Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b as a source of cold-adapted  $\beta$ -galactosidase[ J]. Biomol Eng, 2003, 20: 317-324.
- [ 6] Tereza S, Dohnalek J, Vojtech S. Cold-active  $\beta$ -Galactosidase from *Arthrobacter* sp. C2-2 forms compact 660 kDa hexamers; crystal structure at 1.9 Å<sup>o</sup> resolution[ J]. Mol Biol, 2005, 353: 282-294.
- [ 7] Jame S A C. Protein engineering of a cold-active  $\beta$ -galactosidase from *Arthrobacter* sp. SB to increase lactose hydrolysis reveals new sites affecting low temperature activity[ J]. Extremophiles, 2006, 10: 515-524.
- [ 8] Dhananjay S K, Mulimani V H. Purification of  $\alpha$ -galactosidase and invertase by three-phases partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae* specificities[ J]. Biotechnol Lett, 2008, 30: 1565-1569.
- [ 9] Coombs J M, Brenchley J E. Biochemical and phylogenetic analyses of a cold-active  $\beta$ -galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA[ J]. Appl Environ Microb, 1999, 65: 5443-5450.
- [ 10] Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology[ M]. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md, 1984.