

1 株产 α -半乳糖苷酶乳球菌的分离鉴定及酶学特性

周晶辉, 胡超, 刘晓柱, 彭珍子, 张学文*

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 从湘西富含豆粕下脚料土壤中筛选鉴定出 1 株产 α -半乳糖苷酶细菌, 对其进行显微形态观察、分子生物学鉴定及酶学特性分析。结果表明, 该细菌为球形细菌, 革兰氏染色阳性, 16S rDNA 序列与乳球菌有 98% 的同源性, 可以确定为乳球菌属。细菌产分泌性 α -半乳糖苷酶, 其胞外 α -半乳糖苷酶摇瓶发酵液初酶活为 6.21 U/mL, 在 45 °C、pH 5.5 时该酶活性表现为最大值。酶的表达受 D-棉籽糖的诱导和葡萄糖的抑制, 当 D-棉籽糖的浓度为 30 μ mol/mL 时诱导效果最佳, 当葡萄糖浓度为 30 μ mol/mL 时对该酶的合成有较明显的抑制作用, 表现为糖代谢操纵子的典型调控方式。

关 键 词: α -半乳糖苷酶乳球菌; 筛选; 鉴定; 酶学特性

中图分类号: S154.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0022-04

Screening of a strain of *Lactococcus* that produce of α -galactosidase and the enzymatic characteristics analysis

ZHOU Jing-hui, HU Chao, LIU Xiao-zhu, PENG Zhen-zi, ZHANG Xue-wen*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A strain of α -galactosidase producing bacterium was screened out from the soil rich in soybean wastes of Western Hunan. The bacterium morphology observation, molecular biological identification and enzymatic characteristics was analysed. The bacterium was a stained gram positive and its 16S rDNA had homology with *Lactococcus*. It was identified as a strain bacterium of *Lactococcus* family. The bacteria produced an excretive α -galactosidase. The maximal α -galactosidase activity of shaking cultured supernatant was 6.21 U/mL. The α -galactosidase showed the enzyme activity was the biggest with the value of pH5.5 and the tempertured of 45 °C. The enzyme gene must be regulated in the typical glycolytic operon mode that the enzyme production could be induced by the substrate and inhibited by glucose. The best induction effect was obtained when the D-raffinose concentration reached 30 μ mol/mL and it was inhibited when glucose concentration reached 30 μ mol/mL.

Key words: α -galactosidase lactococcus; screening; identification; enzymatic characteristics

α -半乳糖苷酶(α -galactosidase, EC3.2.1.22)能够特异性水解 α -半乳糖苷结构的碳水化合物^[1-2]。 α -半乳糖苷酶作为酶制剂添加到豆类饲料中, 可以降解半乳糖苷寡糖类抗营养因子, 有效减少肠道疾病的发生^[3-5]。目前, 普通 α -半乳糖苷酶制剂难于满足饲料用酶制剂对耐热性和耐酸性的特殊要求, 因此, 研发饲用型 α -半乳糖苷酶具有很好的市场前景。

笔者以湖南湘西地区富含豆粕的土壤为材料, 筛

选获得 1 株产 α -半乳糖苷酶的细菌, 经显微观察及基于 16S rDNA 的序列分析, 初步判定细菌种属, 并结合液体发酵培养对其酶学特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材 料

采集湘西某豆腐店周围富含豆粕下脚料的土

收稿日期: 2010-10-29

基金项目: 湖南省科学技术厅项目(01JZY2099)

作者简介: 周晶辉(1986—), 男, 土家族, 湖南张家界人, 硕士研究生; *通信作者, xwzhang@hunau.net

壤样品,封存于无菌塑料袋中,4℃保存,用于制备土壤悬液。初筛培养基^[6]:酵母提取物 5 g,胰化蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,琼脂粉 15 g,蒸馏水 1 000 mL,调 pH 值为 7.0,121℃灭菌 20 min。复筛培养基:酵母提取物 5 g,胰化蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,棉籽糖 2.5 g,调 pH 值为 7.0,121℃灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株筛选

土壤样品制成 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度的土壤菌悬液,分别涂布于初筛培养基(90 mm 平板添加 50 μ L 2 mg/mL X- α -gal),37℃培养 48 h,筛选呈蓝色的菌落^[7]。复筛结合液体发酵培养,选择酶活较高的菌株,划线纯化,显微镜检查纯度,得菌株纯培养物。

1.2.2 纯化菌株显微形态及基于 16S rDNA 的分子鉴定

纯化菌株革兰氏染色,显微形态观察,采用 CTAB/NaCl 方法^[8]提取细菌全基因组 DNA,以细菌 16S rDNA 通用上游引物 5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3'和下游引物 5'-ACGGTTACCTTGTTAC GACTT-3'扩增纯化菌株 16S rDNA 基因片段,测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。根据测序结果,用 Blast 程序与 GenBank 上已经登录的菌株 16S rDNA 序列进行比对,分析比对结果。

1.2.3 标准曲线的制作及酶活的测定

以不同浓度的对硝基酚为底物,在 $OD_{405\text{nm}}$ 处进行测定并绘制标准曲线^[9]。采用对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖(P-PNG)法^[10-12]对菌株分泌的 α -半乳糖苷酶的酶活进行测定。酶活单位定义为:在 pH 4.0、37℃条件下,每分钟分解底物生成 1 μ mol 对硝基酚所需要的酶量为 1 个 α -半乳糖苷酶酶活单位。

1.2.4 pH 和温度对 α -半乳糖苷酶活性的影响

采用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲体系配制 pH 分别为 2.6、3.0、3.6、4.0、4.4、5.2、5.6、6.0、6.6、7.2、8.0 的缓冲液,测定酶活力,以酶活力最高者定为 100%,以相对酶活力对所对应的 pH 值作图;将酶液与最适宜 pH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液分别在 20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80℃水浴 1 h,测定酶活力,得到酶液在不同反应温度下的酶活力,以酶活力最高者定为 100%,以相对

酶活力对温度作图。

1.2.5 细菌酶基因表达调控分析

收集不同浓度棉籽糖诱导下的发酵液上清 1 mL,各取 200 μ L 分别置于酶标板的加样孔中,加入 20 μ L 2 mg/mL 的 X- α -gal 溶液,同时以液体发酵培养基作为空白对照,37℃温浴 12 h 后,置于 4℃冰箱充分显色,观察不同浓度棉籽糖诱导下显色情况。

1.2.6 葡萄糖和棉籽糖浓度对菌株产 α -半乳糖苷酶的影响

挑取单菌落接种于不同浓度的葡萄糖和棉籽糖的液体培养基中,葡萄糖及棉籽糖的浓度分别设置为 10、20、30、40、50 μ mol/mL,37℃振荡培养 48 h,在最适 pH 值和温度的条件下,分析葡萄糖和棉籽糖浓度对菌株产 α -半乳糖苷酶的活性影响。

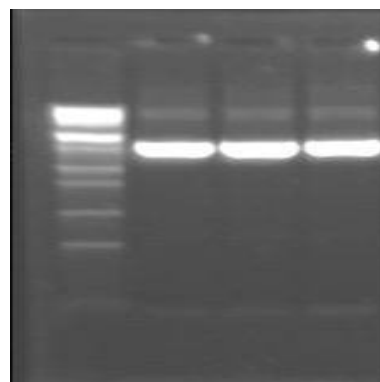
2 结果与分析

2.1 菌株的筛选及显微形态鉴定

通过添加 X- α -gal 显色底物的筛选培养基培养,结合液体发酵培养基筛选,得到了 1 株产 α -半乳糖苷酶细菌,肉眼观察细菌菌落边缘规则,微隆起,表面湿润,用革兰氏染色,分离菌株在显微镜下观察,结果,分离菌株呈现紫色,为革兰氏阳性细菌,细胞为球形。

2.2 细菌的 16S rDNA 克隆测序与菌种鉴定

在分离细菌基因组 DNA 后,以 16S rDNA 的通用引物进行该基因的 PCR 扩增,重复的扩增都得到了大小确定的分子(图 1),扩增分子克隆到 T-载



M 1 kb plus DNA 分子量标准; 1~3 目的片段扩增结果。

图 1 分离菌株 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig.1 16S rDNA PCR product of screened strain

体并测序, 序列用 BLAST 程序与 GenBank 中已经登录的 16S rDNA 进行核苷酸序列同源性比较, 发现其与乳球菌 16S rDNA 同源性达 98%, 可以判定分离细菌为乳球菌属细菌。

2.3 粗酶活测定结果

以不同浓度的对硝基酚在 405 nm 处吸光度平均值为 x 轴, 以对硝基酚的浓度为 y 轴绘制标准曲线(图 2), 用 Excel 办公软件作图, 得公式 $y=53.314x+0.2128$, 其中 $R^2=0.9968$ 。

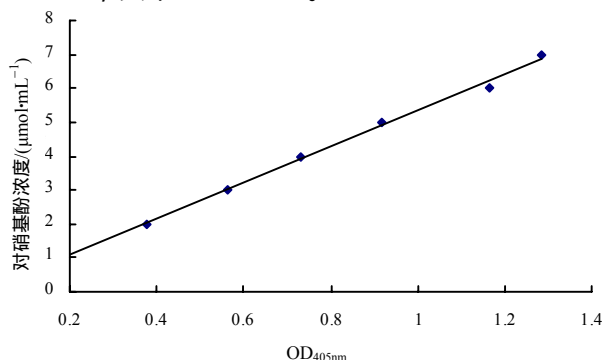


图 2 对硝基酚 OD_{405} 的标准曲线

Fig.2 Standard curve of p-nitrophenol

取摇瓶发酵上清液 1 mL 加入 pH 4.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 2 mL 中, 37 °C 预热 5 min 后与 1 mL 10 mmol/L 的 PNPG 底物反应 10 min, 用 6 mL 0.2 mol/L $NaCO_3$ 终止反应, 分光光度计测定 405 nm 处吸光度值, 同时设置对照管, 测得吸光度值为 1.160, 计算得发酵上清液酶活为 6.21 U/mL。

2.4 pH 及温度对分离菌株分泌 α -半乳糖苷酶活性的影响

图 3 分析表明, pH 约 5.5 时, 所分离菌株分泌的 α -半乳糖苷酶表现相对较高的酶活力; 图 4 表明在较低的温度(20 ~ 40 °C)范围内, 相对酶活力随着

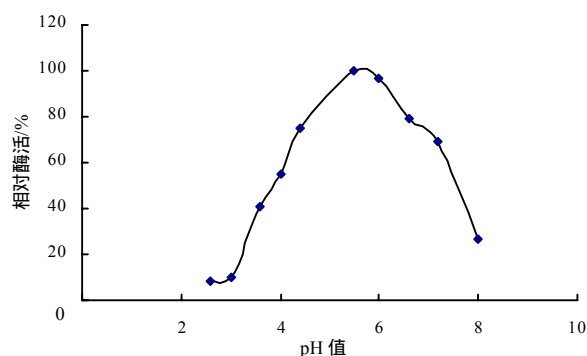


图 3 不同 pH 条件下细菌 α -半乳糖苷酶活性

Fig.3 α -galactosidase activity of bacterium under different pH condition

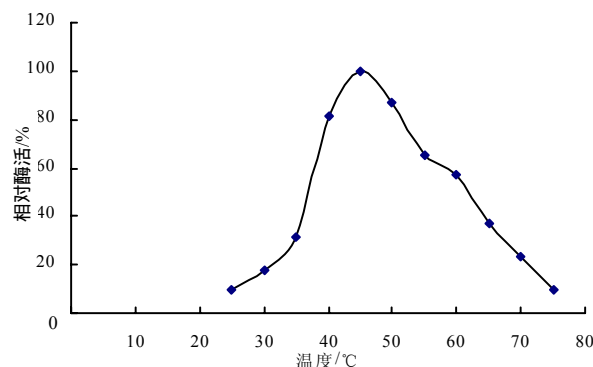


图 4 不同温度条件下细菌 α -半乳糖苷酶活性

Fig.4 α -galactosidase activity of bacterium under different temperature condition

温度的升高而增加, 随着温度的升高, 酶活力逐渐下降, 其最适宜温度为 45 °C 左右。

2.5 棉籽糖诱导下的酶与底物作用的显色反应

通过以棉籽糖作底物和 X- α -gal 显色的酶活性观察, 进行酶表达诱导的分析。上清液显色反应结果表明, 分离菌株分泌的 α -半乳糖苷酶为胞外酶, 能够使 X- α -gal 分解产生蓝色沉淀, 从显色反应的程度来看, 低浓度的 D-棉籽糖对酶的分泌有诱导作用, 当棉籽糖的浓度为 30 μ mol/mL 时, 诱导效果最佳, 显色反应较为明显。

2.6 棉籽糖和葡萄糖对菌株分泌 α -半乳糖苷酶的影响

根据显色反应建立起酶活力的分析方法后, 以不同浓度棉籽糖和葡萄糖分别对摇瓶发酵菌进行处理, 分析图 5 可知, 分离菌株产 α -半乳糖苷酶受到棉籽糖的诱导和葡萄糖的抑制作用, 当棉籽糖的浓度约为 30 μ mol/mL 时, 诱导效果最佳, 酶活性达到最高, 随着棉籽糖浓度的增加, 其对 α -半乳糖

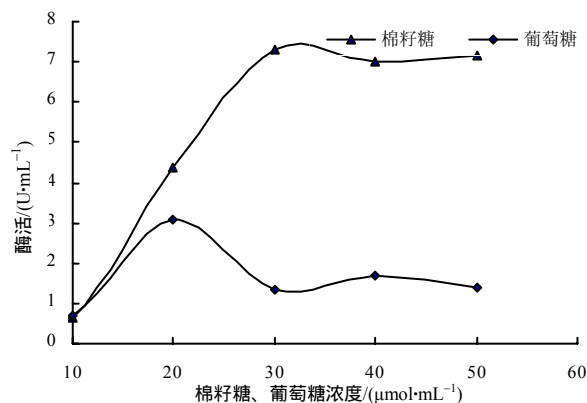


图 5 不同棉籽糖和葡萄糖浓度下细菌产酶的活性

Fig.5 α -galactosidase activity of bacterium under different concentrations of raffinose and glucose

苷酶的诱导合成作用已不明显；在较低葡萄糖浓度(0~20 $\mu\text{mol/mL}$)下，分离菌株合成 α -半乳糖苷酶，随着葡萄糖的浓度增加而呈现上升趋势，随着葡萄糖浓度不断升高，菌株合成 α -半乳糖苷酶受到葡萄糖的抑制，酶活力逐渐下降。

3 讨 论

微生物合成的 α -半乳糖苷酶为诱导型酶，高浓度的葡萄糖对其合成具有抑制作用^[10]，且不同种类的微生物合成 α -半乳糖苷酶需要不同的诱导物。本研究结果表明，分离菌株合成 α -半乳糖苷酶受棉籽糖的诱导，可能是 α -半乳糖苷酶的合成受到相关操纵子的调控，各个基因独立发挥作用，棉籽糖作为酶的作用底物时起诱导作用进而提高菌体生长量及酶的合成量；合成受到葡萄糖的抑制，可能是分离菌株存在葡萄糖效应引起的，当培养基中有葡萄糖存在时，菌株会优先利用葡萄糖，葡萄糖的某种分解代谢物能降低生物体内 cAMP 的水平，影响 RNA 聚合酶与启动子结合，以至转录作用不能进行，抑制了产酶基因的表达，酶的合成处于本底表达水平。但葡萄糖在 0~20 $\mu\text{mol/mL}$ 时对酶的产生具有正向作用，可能是低浓度葡萄糖有利于细菌的生长，因而整体促进了酶的产生。

对霉菌(青霉)、植物(咖啡豆)^[13-14]等 α -半乳糖苷酶的研究已取得重要进展，诸多 α -半乳糖苷酶基因已经被克隆^[15-16]。由于细菌来源的 α -半乳糖苷酶为单肽酶，活性发挥不需要糖基化，结构也更为简单，更利于操作，因此，借助于基因工程技术手段获得酶活高、耐热、耐酸性强的 α -半乳糖苷酶成为研究热点。本研究已分离和鉴定出产 α -半乳糖苷酶细菌，将以这一菌株为出发菌株，进行酶基因克隆和改造。

参考文献:

- [1] Gregg Wallis L F, Richard Easton L, Karen Jolly, et al. Galactofuranoic-oligoman nose N-linked glycans of α - galactosidase A from *Aspergillus niger*[J]. Eur J Biochem, 2001, 268: 4134-4143.
- [2] Naumoff D G. Phylogenetic analysis of α -galactosidases of the GH27 family [J]. Molecular Biology, 2004, 38: 388-399.
- [3] Donkoron, Henrkssona, Vasiuevict, et al. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yoghurt [J]. Journal of Food Science, 2005, 70: 375-381.
- [4] Kamaly K M. Bifidobacteria fermentation of soybean milk [J]. Food Research International, 1997, 30: 675-682.
- [5] Schiffmann R, Kopp J B, Austin H A, et al. Enzyme replacement therapy in fabry disease: A randomized controlled trial [J]. JAMA, 2001, 285: 2743-2749.
- [6] 刘彩琴, 何国庆, 陈启和. 一株产 α -半乳糖苷酶菌的分离与选育[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(11):32-35.
- [7] Gossrau R Loida Z. Histochemical detection of α - galactosidase with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactoside [J]. Acta Histochem, 1989, 85: 213.
- [8] 刘晓侠, 林建平, 岑沛霖. 微生物基因组DNA提取方法的比较与改进[J]. 嘉兴学院学报, 2007, 19(3): 48-50.
- [9] 许尧新, 姚晓红, 许少春, 等. 两种测定程序对饲用 α -半乳糖苷酶活性检测的结果比较[J]. 浙江农业学报, 2004, 16(6): 349-353.
- [10] Lokuge M A, Mathew C D. Kinetic studies of extracellular alpha-galactosidase from *Citrobacter freundii* [J]. J of the Nation Science Foundation Sri Lanka, 2001, 29: 3-4.
- [11] Sripuan T, Aoki K. Purification and characterization of thermostable alpha-galactosidase from *Ganoderma lucidum* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2003, 67 (7): 1485-1491.
- [12] Liu Caiquin, Ruan Hui, Shen Huafeng, et al. Optimization of the fermentation medium for α - galactosidase production from *Aspergillus foetidus* ZU-G1 using response surface methodology [J]. Journal of Food Science, 2007, 72(4): 120-125.
- [13] Fridjonsson O, Mattes R. Production of recombinant α -galactosidases in *Thermus thermophilus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4192-4198.
- [14] Boucher I, Vadeboncoeur C, Moineau S. Characterization of genes involved in the metabolism of α -galactosidases by *Lactococcus raffinolactis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4049-4056.
- [15] De Vries R P, Van Den Broeck H C, Dekkers E, et al. Differential expression of three α -galactosidases genes and single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2453-2460.
- [16] Ademark P, de vries R P, Hagglund P, et al. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an α -galactosidases and β -mannosidase involved in galactomannan degradation [J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268: 2982-2990.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 易来宾