

新疆回民自制酸泡菜中产转糖基活性 β -半乳糖苷酶菌株的筛选和鉴定

张宇洁, 王丽军, 关波*, 倪永清, 何顺 (石河子大学食品学院, 新疆石河子 832002)

摘要 [目的]通过可培养的方式从泡菜中分离和筛选产转糖基活性 β -半乳糖苷酶(β -gal)的菌株。[方法]以乳糖为唯一碳源, CaCO_3 溶钙圈和添加 X-Gal 的 MRS 筛选平板进行初筛, 再通过 oNPG 法定测定菌株 β -gal 活性进行复筛, 最后以粗酶液催化乳糖进行转糖基反应, 通过 TLC 分析确认转糖基活性。[结果]通过 3 级筛选, 得到具有转糖基活性 β -gal 的菌株 6 株。结合其形态学、生理生化特征及 16S rDNA 序列同源性分析, 确定筛选获得产转糖基活性 β -gal 菌株中, 5 株为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*), 1 株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。[结论]该研究可为以乳糖为底物高效合成功能性的低聚半乳糖提供新的酶源。

关键词 泡菜; β -半乳糖苷酶; 转糖基活性; 乳酸杆菌; 系统发育

中图分类号 TS 255.53 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)25-0159-03

Screening and Identification of Strains Producing β -galactosidase with Transgalactosylation Activity from the Pickles of Hui in Xinjiang

ZHANG Yu-jie, WANG Li-jun, GUAN Bo et al (School of Food Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002)

Abstract [Objective] To isolate and screen the strains producing transglycosylated active β -galactosidase (β -gal) from pickles by culturable methods. [Method] With lactose as the only carbon source, CaCO_3 calcium solution and X-Gal MRS screening plate were screened, and the activity of strain β -gal was rescreened by oNPG method. Finally, the glycosyl reaction was catalyzed by crude enzyme solution, and the activity of glycosyl group was confirmed by TLC analysis. [Result] A total of 6 strains of transglycosyl activated β -gal were obtained by three stage screening. According to its morphological, physiological and biochemical characteristics and the homology analysis of 16S rDNA sequence, 5 strains of *Lactobacillus fermentum* and 1 strain of *Lactobacillus plantarum* were selected and obtained. [Conclusion] This study provides a new enzyme source for the efficient synthesis of functional Galacto oligosaccharides based on lactose.

Key words Pickles; β -galactosidase; Transglycosylation activity; *Lactobacillus*; Phylogeny

β -半乳糖苷酶(β -半乳糖苷半乳糖水解酶, EC 3.2.1.23; β -gal)能水解多糖或寡糖中的 β -半乳糖苷键, 一些 β -半乳糖苷酶也能催化转糖基反应^[1]。该酶可有效解决乳糖不耐症问题。乳酸菌来源的 β -半乳糖苷酶是胞内酶, 最适 pH 接近中性(pH 6.5 ~ 7.5), 尤其适用于牛乳和乳清中乳糖的水解。乳酸菌作为 β -半乳糖苷酶的来源, 具有多种重要生理功能, 作为食品级微生物, 应用于食品工业具有“先天优势”, 更容易被消费者接受。据相关文献报道, 乳酸菌来源的 β -半乳糖苷酶主要合成 $\beta(1\rightarrow3)$ 和 $\beta(1\rightarrow6)$ 等键型结构的低聚糖, 应用于功能性低聚糖的生产比目前商业化的半乳寡聚糖[主要是 $\beta(1\rightarrow4)$ 键型]更易被肠道微生物所利用, 具有更好的益生效果^[2]。

目前为止, 尽管具有转半乳糖基活性 β -半乳糖苷酶的微生物来源广泛, 但在食品工业获得批准使用并实现工业化生产的只有米曲霉和克鲁维酵母菌属等少数微生物^[3-4]。因此寻找安全性更好、酶学性质更稳定, 并具有一定生物特性的 β -半乳糖苷酶成为该领域的研究热点。笔者对新疆回民自制酸泡菜中产转糖基活性乳糖酶的菌株进行了分离和鉴定, 并对其乳糖酶的转糖基活性进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料。该试验所用泡菜取自新疆焉耆地区回民传统手工酸白菜。

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

作者简介 张宇洁(1992—), 女, 新疆石河子人, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物检测技术。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事低温微生物及生物技术研究。

收稿日期 2018-05-04

1.1.2 培养基。MRS 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 牛肉浸膏 10 g/L, 酵母浸膏 5 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 吐温-80 1 mL/L, K_2HPO_4 2 g/L, 醋酸钠 5 g/L, 柠檬酸二铵 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, 琼脂 15 g/L (pH 6.2 ~ 6.4)。PY 基础培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 盐溶液 40 mL/L。明胶基础培养基: 蛋白胨 5 g/L, 牛肉膏 3 g/L, 明胶 120 g/L, pH 7.0 ~ 7.2。硫酸亚铁半固体培养基: 蛋白胨 10 g/L, 牛肉浸粉 3 g/L, 酵母提取物 3 g/L, 硫酸亚铁 0.2 g/L, 硫代硫酸钠 0.3 g/L, NaCl 5 g/L, 琼脂粉 12 g/L, 调 pH 7.4。

1.2 方法

1.2.1 产 β -gal 菌株的分离、初筛及纯化。取泡菜样品适量于灭菌生理盐水中, 37 °C 摇床 2 h。用已灭菌的生理盐水稀释, 选 3 个稀释度, 每个稀释度取 0.1 mL 菌种稀释液, 分别滴加到含 2% 碳酸钙的 MRS 平板上涂布, 37 °C 培养 24 h。接种环挑取溶钙圈单菌落于含 X-Gal 的筛选平板上划线分离, 37 °C 培养 24 h。挑取蓝色单菌落于 MRS 平板上划线纯化, 37 °C 培养 24 h。

1.2.2 β -gal 酶活的测定。

1.2.2.1 oNP 标准曲线的绘制。取 oNP 标准品配制成 1 mmol/L (1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) oNP 母液, 用 pH 7.0 的磷酸缓冲液稀释, 每毫升分别含 oNP 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 μmol , 以 pH 7.0 的磷酸缓冲液为空白, 测波长 420 nm 处吸光度, 绘制标准曲线。

1.2.2.2 β -gal 酶活力的计算。50 μL oNPG 溶液(50 mmol/L pH 6.5)加入酶标板小孔中, 再加入 50 μL 的粗酶液, 于 37 °C 下反应 10 min, 加入 200 μL 0.5 mol/L 的碳酸钠溶液终止反应, 于 420 nm 波长处测定吸光值。

1.2.3 β -gal 转糖基反应的 TLC。

1.2.3.1 转糖基试验。取 500 μ L 用磷酸缓冲液 (50 mmol/L pH 6.5) 配制的 20% 乳糖溶液置于离心管中, 水浴预热至 37 $^{\circ}$ C 后加入 1 mL 粗酶液, 37 $^{\circ}$ C 反应 24 h 后, 沸水浴灭酶 10 min, 将样品用无水乙醇稀释至浓度为 1 mg/mL。通过 TLC 分析低聚糖产量。

1.2.3.2 TLC 检测。取活化过的硅胶 G 玻璃板一块, 用微量进样器点样, 注意设置标准糖对照, 用量约为毛细管 1/3, 上展层剂使用氯仿、冰乙酸和水的混合物 (氯仿:冰乙酸:水=30:35:5), 层析 1 h, 取出晾干后喷雾显色剂, 置于烘箱中, 85 $^{\circ}$ C 烘烤 10 min, 观察层析板上显现的不同颜色并比较, 初步确认转糖基产物, 从而获得产转糖基活性乳糖酶的菌株。

1.2.4 产 β -gal 菌株的鉴定^[5]。

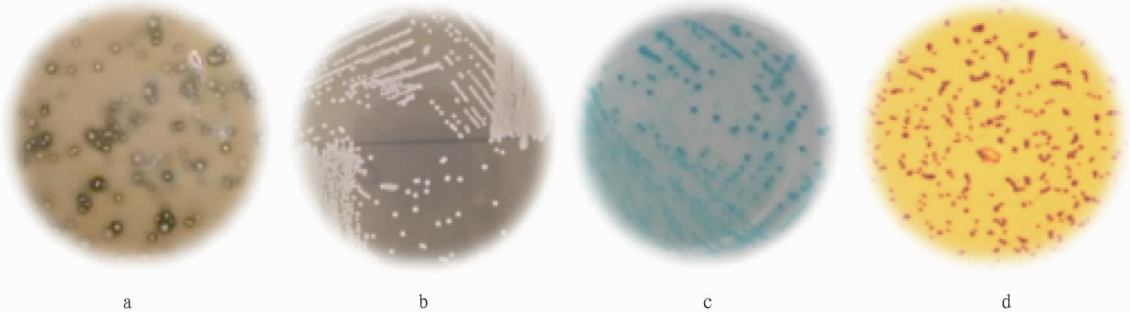
1.2.4.1 菌株的形态特征。接菌于营养琼脂培养基 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 观察菌落形状、色泽、透明度等培养特征。挑取少许菌体进行革兰氏染色观察。

1.2.4.2 产 β -gal 菌株的生理生化特性。过氧化氢酶试验; 糖发酵试验; 明胶液化试验; 淀粉水解试验; 硫化氢试验。

1.2.4.3 产 β -gal 菌株的分子鉴定。采用尿素法提取产酶菌株的基因组 DNA^[1]。采用 16S rRNA 基因通用引物 27f 和 1492r 扩增菌株的 16S rDNA。将扩增 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。序列比较分析建立系统发育树。

2 结果与分析

2.1 产 β -gal 菌株的形态特征 从传统回民自制泡菜中分离纯化的菌株均为杆状, 形成乳白色、圆形菌落, 形态如图 1b 所示, 在添加 CaCO₃ 的 MRS 平板上菌落周围具有明显的溶钙圈 (图 1a), 革兰氏染色呈阳性 (图 1d), 初步表明分离纯化的菌株应为乳酸菌菌株。将纯化获得的乳酸菌菌株接种到添加 X-Gal 的 MRS 平板上进行初筛, 菌落变蓝则表明筛选获得的乳酸菌菌株能够产乳糖酶 (图 1c)。该研究共筛选获得产 β -gal 菌株 25 株。



注: a. CaCO₃ MRS 平板; b. MRS 平板; c. X-Gal MRS 平板; d. 革兰氏染色

Note: a. CaCO₃ MRS plate; B. MRS flat; C. X-Gal MRS plate; D. Gram staining

图 1 部分菌株形态、X-Gal 初筛和革兰氏染色

Fig. 1 Partial strain morphology, X-Gal screening and gram staining

2.2 产 β -gal 菌株酶活的测定

2.2.1 oNP 标准曲线的绘制。以每毫升 oNP 的浓度为横坐标, 以波长 420 nm 处测得的吸光度为纵坐标, 得到 oNP 标准曲线, 如图 2 所示。

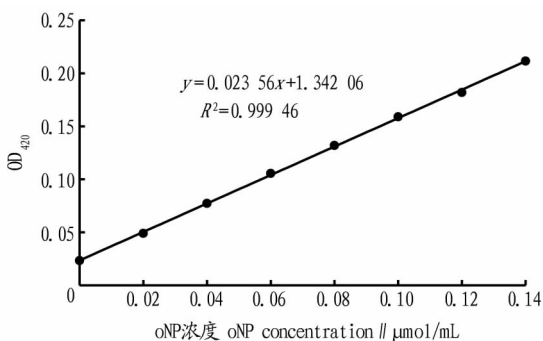


图 2 乳糖酶的酶活标准曲线

Fig. 2 Lactase enzyme activity standard curve

2.2.2 产 β -gal 菌株的酶活。采用 oNPG 法测定 25 株产酶菌株的酶活, 25 株初筛菌株的乳糖酶酶活见表 1。从表 1 中可知, 在相同培养基、接种量、培养温度 37 $^{\circ}$ C 及培养 36 h 后不同菌株所得粗酶液的酶活最低为 2.799 U/mL (PC-25),

最高为 26.289 U/mL (PC-17)。

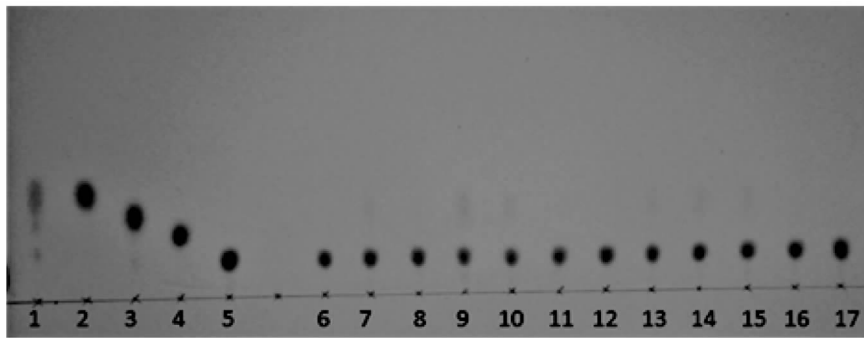
表 1 产酶菌株的酶活

Table 1 Enzyme activity of enzyme-producing strains

菌株编号 Strain number	菌落颜色 Colony color	酶活 Enzyme activity U/mL	菌株编号 Strain number	菌落颜色 Colony color	酶活 Enzyme activity U/mL
PC-1	蓝	3.376	PC-14	蓝	4.931
PC-2	蓝	21.355	PC-15	蓝	3.995
PC-3	蓝	4.778	PC-16	蓝	20.996
PC-4	蓝	6.313	PC-17	蓝	26.289
PC-5	蓝	20.851	PC-18	蓝	3.022
PC-6	蓝	3.493	PC-19	蓝	3.799
PC-7	蓝	3.767	PC-20	蓝	3.070
PC-8	蓝	23.177	PC-21	蓝	2.894
PC-9	蓝	25.699	PC-22	蓝	22.087
PC-10	蓝	25.593	PC-23	蓝	3.260
PC-11	蓝	7.108	PC-24	蓝	21.372
PC-12	蓝	3.715	PC-25	蓝	2.799
PC-13	蓝	3.169			

2.3 产 β -gal 菌株粗酶液以乳糖为底物的 TLC 分析 对相同条件下处理的样品进行转糖基反应, 通过 TLC 分析其产物

如图 3 所示。得到 6 株具有转糖基活性的菌株,分别为 PC-2、PC-4、PC-5、PC-8、PC-9、PC-10。



注:1 为葡萄糖、半乳糖、蔗糖和乳糖的混合物(混合物中各组分浓度均为 1 mg/mL);2 为葡萄糖;3 为半乳糖;4 为蔗糖;5 为乳糖;6~17 为 1~12 号菌 β -gal 反应后的产物

Note:1 is a mixture of glucose, galactose, sucrose and lactose (the concentration of each component in the mixture is 1 mg/mL); 2 is glucose; 3 is galactose; 4 is sucrose; 5 is lactose; 6~17 is the product of β -gal reaction of bacteria 1~12

图 3 以乳糖为底物的 TLC 分析

Fig. 3 TLC analysis of lactose as substrate

2.4 产转糖基活性 β -gal 菌株的生理生化特性 菌株的生理生化鉴定结果显示,6 株菌均能发酵葡萄糖、乳糖,4 号菌还可以发酵蔗糖、麦芽糖、甘露糖,6 株菌均不能发酵阿拉伯糖、鼠李糖,且淀粉水解试验、明胶水解试验、硫化氢产生试验均为阴性,表明 6 株菌株在代谢过程中均不能分泌产生淀粉酶和尿素酶来降解大分子物质,也不能产过氧化氢和硫化氢。这些特征与乳酸杆菌的特征极为相似,综上初步断定 6

株菌为乳杆菌。

2.5 序列分析 以筛选获得的具有转糖基活性乳糖酶菌株的 16S rDNA 序列与 BLAST 比对获得的具有相似性的 16S rDNA 序列构建系统发育树(图 4),表明筛选获得的产转糖基活性乳糖酶的菌株均为乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)菌株,其中 5 株为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*),1 株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

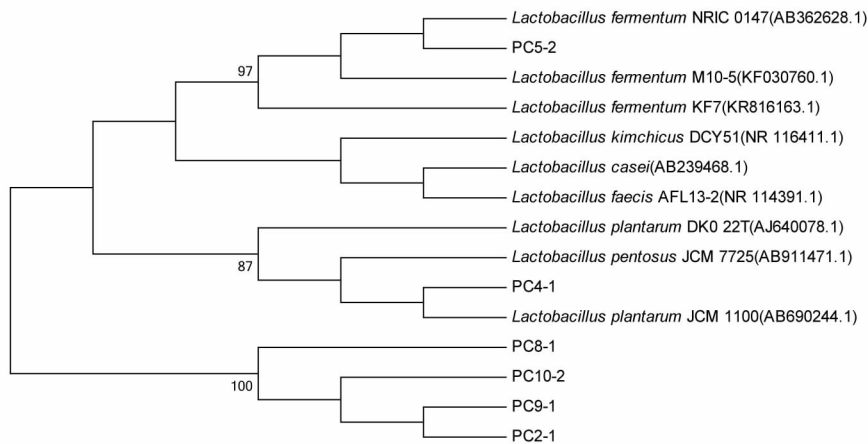


图 4 回民泡菜中筛选的乳酸菌菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the strain screened from pickles of Hui

3 讨论

该试验以新疆回民自制酸泡菜为研究材料,利用 CaCO_3 溶钙圈和添加 X-Gal 的 MRS 筛选平板进行初筛获得产乳糖酶的疑似乳酸菌菌株 25 株;以浓度 20% 的乳糖为转糖基反应底物与适量粗酶液反应,产物采用 TLC 技术鉴定,获得产转糖基活性乳糖酶的菌株 6 株。采用革兰氏染色、糖发酵试验、淀粉水解试验、16S rDNA 序列技术等 7 种方法对菌株进行了鉴定,得出了产转糖基活性乳糖酶菌株的种属关系,确定其中 5 株为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*),1 株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

生产的趋势,现已有多种不同的产转糖基化 β -半乳糖苷酶微生物的研究,并且还在发展和寻找新的微生物酶源^[6]。乳杆菌属于益生菌,其广泛存在于动物肠道、含碳水化合物动植物发酵制品中,过去人们更加注意乳酸杆菌和双歧杆菌对乳糖水解活性的研究,而对转糖基活性提高发酵乳制品质量的研究很少。近年来,双歧杆菌及乳杆菌来源的转糖基活性 β -半乳糖苷酶由于具有独特的转糖基特性,逐渐受到关注^[7-10]。该研究筛选的产转糖基活性 β -半乳糖苷酶的植物乳杆菌和发酵乳杆菌,为以乳糖为底物高效合成功能性的低聚半乳糖提供了新的酶源。

目前,产低聚半乳糖微生物酶的使用是国际半乳寡聚糖

(下转第 178 页)

在后期杂草清除设备上,为了便于进行叠加分析,将杂草识别结果和原始图像叠加,如图6所示,便于后期设备的精准作业。



图6 叠加分析图(红色部分为杂草)

Fig. 6 Superposition analysis (red part is weeds)

为了评价该研究算法识别杂草的正确率,根据野外实地测量的杂草面积和该研究算法提取的杂草面积比值结果作为正确率,结合无人机飞行高度,确定摄影图像比例尺,最终计算两者面积比值为92.8%^[13-16]。剔除实地测量过程中的误差等因素,表明该研究算法具有很高的实用价值。

4 结论

杂草识别是农业现代化特别是精准农业需要解决的经典问题,该研究从小麦播种时固定的小麦行间距先验知识,提出了杂草识别的行间距算法,通过实验可以得出以下结论:①基于先验知识的小麦行间距可以有效识别小麦生长重要时期的杂草。②该研究算法识别杂草的正确率达到92.8%,可以作为智能杂草清除设备的理论依据。该研究的算法仍存在错误识别等现象,如何结合小麦行直线和 Hough

变换,自动识别小麦行中心点和边界点提高该算法的杂草识别正确率是后续需要完善的。

参考文献

- [1] JI R H, FU Z T, QI L J. Real-time plant image segmentation algorithm under natural outdoor light conditions [J]. New Zealand journal of agricultural research, 2007, 50(5): 847-854.
- [2] SLAUGHTER D C, GILES D K, DOWNEY D. Autonomous robotic weed control systems: A review [J]. Computers and electronics in agriculture, 2008, 61(1): 63-78.
- [3] 李涛,温广月,钱振官,等. 不同类型杂草危害对小麦产量的影响 [J]. 中国植保导刊, 2013, 33(4): 28-30.
- [4] 钱永涛. 基于计算机视觉的小麦长势监控研究 [J]. 农机化研究, 2018, 40(4): 225-229.
- [5] 黄土凯,祁力钧,张建华,等. 基于行宽的玉米行间杂草识别算法 [J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(1): 165-171.
- [6] 祖琴,张水发,曹阳,等. 结合光谱图像技术和SAM分类法的甘蓝中杂草识别研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(2): 479-485.
- [7] 祖琴,赵春江,邓巍,等. 基于可见-近红外光谱分析的圆白菜与杂草识别技术 [J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(5): 1202-1205.
- [8] 赵川源,何东健,乔永亮. 基于多光谱图像和数据挖掘的多特征杂草识别方法 [J]. 农业工程学报, 2013, 29(2): 192-198.
- [9] 白敬,徐友,魏新华,等. 基于光谱特性分析的冬油菜苗田间杂草识别 [J]. 农业工程学报, 2013, 29(20): 128-134.
- [10] 纪寿文,王荣本,陈佳娟,等. 应用计算机图像处理技术识别玉米苗田间杂草的研究 [J]. 农业工程学报, 2001, 17(2): 154-156.
- [11] 吴兰兰,刘俭英,文友先. 基于分形维数的玉米和杂草图像识别 [J]. 农业机械学报, 2009, 40(3): 176-179.
- [12] 王海华,朱梦婷,李莉,等. 基于剪切波变换和无人机麦田图像的区域杂草识别方法 [J]. 农业工程学报, 2017, 33(S1): 99-106.
- [13] 毛文华,王一鸣,张小超,等. 基于机器视觉的苗期杂草实时分割算法 [J]. 农业机械学报, 2005, 36(1): 83-86.
- [14] 陶飞翔,吴一全. 非下采样 Shearlet 变换与参数化对数图像处理相结合的遥感图像增强 [J]. 测绘学报, 2015, 44(8): 884-892.
- [15] DEMIREL H, ANBARJAFARI G. Image resolution enhancement by using discrete and stationary wavelet decomposition [J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2011, 20(5): 1458-1460.
- [16] FENG W S, LEI H. Single-image super-resolution with total generalised variation and shearlet regularisations [J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2014, 8(12): 833-845.

(上接第161页)

参考文献

- [1] 张树政. 酶制剂工业 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 655-670.
- [2] 张宏志, 马艳弘, 黄开红, 等. 产 β -半乳糖苷酶乳酸菌的筛选及酶法合成低聚半乳糖的 GC-MS 分析 [J]. 现代食品科技, 2015(12): 355-361.
- [3] 毕海洋. 马克斯克鲁维酵母菌乳糖酶基因的高效表达和高活力乳糖酶的生产 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [4] 曾倩, 王毓舒, 孙鲲, 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. BS120414) 的筛选、鉴定和产酶条件研究 [J]. 极地研究, 2011, 23(2): 108-114.
- [5] 郭勇. 酶工程研究进展与发展前景 [J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2002, 30(11): 130-133.
- [6] 杜鹏. 乳品微生物学实验技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008.
- [7] 陆文伟, 孔文涛, 孔健, 等. 发酵乳杆菌 β -半乳糖苷酶转糖基活性研究 [J]. 山东大学学报(理学版), 2008, 43(7): 83-87.
- [8] KANDARI S, CHOI Y J, LEE B H. Purification and characterization of hydrolytic and transgalactosyl α -galactosidase from *Lactobacillus helveticus* ATCC 10797 [J]. European food research and technology, 2014, 239(5): 877-884.
- [9] ARREOLA S L, INTANON M, WONGPUTTISIN P, et al. Transferase activity of lactobacillal and bifidobacterial β -galactosidases with various sugars as galactosyl acceptors [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2016, 64(12): 2604-2611.
- [10] GARRIDO D, RUIZ-MOYANO S, KIRMIZI N, et al. A novel gene cluster allows preferential utilization of fucosylated milk oligosaccharides in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* SC596 [J]. Scientific reports, 2016, 6: 35045.

科技论文写作规范——作者

论文署名一般不超过5个。中国人姓名的英文名采用汉语拼音拼写, 姓氏字母与名字的首字母分别大写; 外国人姓名、名字缩写可不加缩写点。