

# 产 $\beta$ -半乳糖苷酶菌株的分离和筛选

郑铁曾 涂提坤 王建华 徐子渊

(天津市工业微生物研究所)

$\beta$ -半乳糖苷酶 (EC<sub>3.2.1.23</sub>) 俗称乳糖酶, 它可催化乳糖水解为葡萄糖和半乳糖。有的婴儿在肠道中先天性缺乏此酶, 对乳制品中的乳糖消化吸收极差, 以致产生腹胀、腹泻等症状, 称之为乳糖不耐症。又因乳糖在水中的溶解度较

小, 常使乳制品如炼乳或奶粉中的乳糖析出, 影响外观和口感。近几年来国外有许多利用微生物产生  $\beta$ -半乳糖苷酶的报道<sup>[1-6]</sup>, 其制剂主要用于处理乳制品和作消化剂, 而国内尚未见这方面的报道。

# 材 料 和 方 法

## 一、菌株

酵母菌和部分霉菌为本组从土壤、污泥样品中分离得到。部分霉菌由中国科学院微生物研究所和本所糖化酶组提供。

## 二、培养基成分

1. 乳糖合成培养基(%)：乳糖 2，磷酸氢二铵 0.5，磷酸二氢铵 0.2，硫酸镁 0.02，氯化钾 0.05，硫酸亚铁 0.001。含维生素类(微克/升)：硫胺素 200，核黄素 100，烟酸 200，吡哆醛 200，泛酸 200，肌醇 100，生物素 100。

2. 酵母菌生长培养基(%)：乳糖 2，蛋白胨 0.1，酵母膏 0.1。

3. 麦芽汁培养基：啤酒厂的麦芽汁稀释至波美度 4，制成平板或斜面。

4. 玉米粉培养基：4% 玉米粉，pH2.5—3.0。

5. 麸皮培养基：麦麸：水=1:0.9，pH4.0—4.5，每个培养皿装 10 克，1 公斤/厘米<sup>2</sup>灭菌 30 分钟。

6. 察氏培养基(%)：硝酸钠 0.3，磷酸氢二钾 0.1，氯化钾 0.05，硫酸镁 0.005，硫酸亚铁 0.001，蔗糖 2，琼脂 2。

## 三、分离和筛选方法

1. 菌株的分离：在霉菌中主要分离黑曲霉群的菌株。培养皿内放入灭菌圆滤纸片，倾入玉米粉培养基。然后倒入土壤或污泥悬液 1 毫升，刮匀。30℃ 培养四天，待菌长出后，将菌落接入察氏培养基斜面。

酵母菌分离步骤：1 克土样或污泥样品 → 麦芽汁培养基  $\xrightarrow[28^{\circ}\text{C 增殖 24 小时}]{\text{氯霉素 90 单位/毫升}}$  稀释 → 乳糖合成培养基平板  $\xrightarrow{28^{\circ}\text{C 培养 三天}}$  麦芽汁斜面。

2. 筛选：霉菌菌株接种于麸皮培养基，30℃ 培养 2.5 天，培养物以 20 毫升水抽提 2 小

时，为粗酶液。

乳糖的水解：取粗酶液 2 毫升，10% 乳糖 2 毫升，0.2 M pH4.0 醋酸缓冲液 2 毫升，40℃ 保温 1 小时。反应液进行纸层析。用新华 2 号层析滤纸。溶剂系统为正丁醇：吡啶：水=6:4:3，上行展层二次。二苯胺-苯胺喷雾 80℃ 烘 5 分钟显色。

酵母菌株接人生长培养基，28℃ 振荡培养 2 天，观察酵母生长情况。以次亚碘酸法测定残余的还原糖<sup>[7]</sup>。

3.  $\beta$ -半乳糖苷酶活力的比较：参照 Borglum<sup>[8]</sup> 方法，以邻硝基酚  $\beta$ -半乳糖苷为底物(简称 ONPG)测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活力。在下述条件下，每分钟能水解产生 1 微克分子邻硝基酚的酶量定为 1ONPG 单位。

4. 霉菌  $\beta$ -半乳糖苷酶活力的测定：吸取 1 毫升 0.25% ONPG 溶液加入试管内，加 2.5 毫升 0.2 M pH4.5 醋酸缓冲液于 55℃ 水浴中预热 5 分钟，然后加入 0.5 毫升稀释酶液，继续保温 15 分钟。吸取 1 毫升反应液加入预先盛有 1 毫升 5% 碳酸钠溶液的比色管中，定容至 10 毫升，于 420 毫微米波长比色。以未接种的培养基抽提液作为空白。

5. 酵母菌  $\beta$ -半乳糖苷酶活力的测定：将筛选试验的摇瓶培养物离心，收集菌体，用 0.1 M pH7.0 磷酸缓冲液洗涤菌体一次。把菌体悬浮于 5 毫升同一缓冲液内，吸 3 毫升悬液于试管中，用煮沸 10 分钟的死菌体悬液作为空白。40℃ 预热 5 分钟后加入 1 毫升 0.25% 的 ONPG 溶液，继续保温 15 分钟，吸取反应液 1 毫升加 1 毫升 5% 碳酸钠溶液，定容至 5 毫升，离心后清液在 420 毫微米波长比色。

## 结 果 与 讨 论

### 一、霉菌的 $\beta$ -半乳糖苷酶

以上述方法培养的粗酶液进行乳糖水解，纸层析图谱表明多数霉菌均有不同程度产  $\beta$ -半乳糖苷酶能力，见图 1。挑选纸层析图谱上葡萄糖和半乳糖斑点较深者共 106 株。

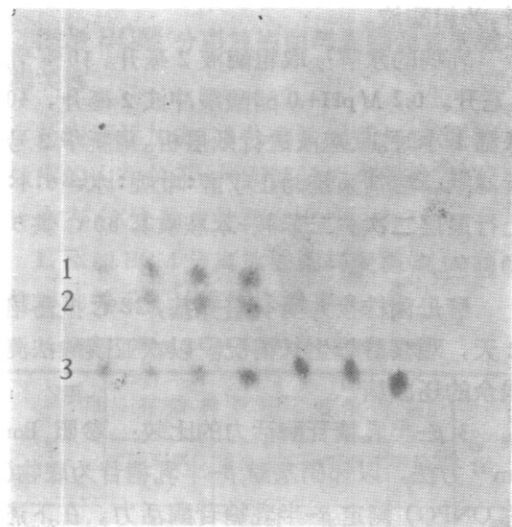


图1 产 $\beta$ -半乳糖苷酶菌株的酶液水解乳糖纸层析图谱  
图中自左至右为: SM-52, 347, SM-117, 标准品, 3.3927, 糖-132, 352; 1为葡萄糖, 2为半乳糖, 3为乳糖。

复筛106株霉菌仍采用麸皮培养基, 每皿装10克, 以5毫升孢子悬液接种, 30℃培养2.5天。然后用100毫升水抽提2小时, ONPG法测定酶活力, 结果见表1。其中以SM-117菌株产 $\beta$ -半乳糖苷酶的活力最高。

表1 不同菌株产 $\beta$ -半乳糖苷酶活力的比较

菌号	菌株名称	酶活力 (单位/克麸皮)
SM-117	<i>Aspergillus</i> sp.	23.9
SM-352	<i>Aspergillus</i> sp.	19.7
347	<i>Asp. niger</i>	16.0
3.3927	<i>Asp. niger</i>	9.4
糖-132	<i>Asp. niger</i>	7.3
352	<i>Asp. niger</i>	0.73

## 二、酵母菌的 $\beta$ -半乳糖苷酶

采用乳糖合成培养基(选择性培养基), 分离到的酵母菌几乎都能利用乳糖生长, 但乳糖消耗程度不同。48小时内将乳糖消耗至近零者共有92株。

复筛92株酵母, 收集培养的酵母菌体测定酶活。根据能利用乳糖作碳源的菌株, 推测应有水解乳糖的酶系。表2说明不同酵母菌株 $\beta$ -

半乳糖苷酶活力的差别。

表2 不同酵母 $\beta$ -半乳糖苷酶活力的比较

菌号	酶活力(单位/毫升)	残糖(滴定差数)
S81	0.76	0.1
S82	0.59	0.1
S175	0.44	0.7
S213	0.38	0.5
S377	0.104	0.8
S415	0	0.6
S151	0	0.45

微生物产生 $\beta$ -半乳糖苷酶的报道很多, 但叙述菌株分离和筛选的文章较少。我们在工作中摸索出了切实可行的方法。霉菌产生 $\beta$ -半乳糖苷酶多采用固体培养, 当用较高浓度麸皮制成液体培养基时, 生长的霉菌无乳糖酶活。参照 Lodder<sup>[9]</sup> 的酵母菌分类原则, 即 *K. fragilis* 和 *K. lactis* 性状的描述, 设计了分离产此酶酵母菌的选择性培养基。以乳糖为唯一碳源, 氨盐为氮源, 补以各种维生素。所以分离到的酵母菌多数可利用乳糖, 消耗的快慢间接说明生长的快慢。其相当一部分有 $\beta$ -半乳糖苷酶活力, 这就为筛选工作减少了工作量。酵母菌的 $\beta$ -半乳糖苷酶为胞内酶, 筛选时将酵母制成菌体悬浮液, 比较其酶活力。这种方法比破碎菌体更简便, 适用于筛选菌株。所分离到的霉菌和酵母菌均未进行鉴定。

## 参考文献

- [1] Y. C. Lee: *Arch. Biochem. Biophys.*, 138: 246, 1970.
- [2] Y. Tanaka: *J. Biochem.*, 77: 241, 1975.
- [3] P. C. Comp: *J. Bact.*, 107: 162, 1971.
- [4] Y. Watanabe: *Agric. Biol. Chem.*, 43: 943, 1979.
- [5] R. R. Mahoney: *J. Dairy Sci.* 58: 1620, 1975.
- [6] L. Bierman: *Biochem. Biophys. Acta*, 167: 373, 1968.
- [7] C. A. Browne: *Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis*, 1955.
- [8] G. B. Borglum: *J. Food Sci.*, 37: 619, 1972.
- [9] J. Lodder: *The Yeasts*, 2nd ed. Academic press, INC., London and New York. 1971.