

文章编号:1671-9352(2008)07-0028-05

# 产 $\alpha$ -半乳糖苷酶乳酸菌的鉴定及其发酵性能研究

陈俊亮,杨丽杰,霍贵成\*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**从传统乳制品中筛选到2株高产 $\alpha$ -半乳糖苷酶的菌株,经菌株形态和生理生化特性鉴定以及16S rRNA基因序列分析,确定为发酵乳酸杆菌和长双歧杆菌,并命名为LB21和KLDS2.0509。同时研究了2株菌在豆乳中的酶活力、产酸性能、棉子糖降解能力和蛋白水解能力。菌株LB21和KLDS2.0509表现出不同的 $\alpha$ -半乳糖苷酶活力,其最高酶活力分别为26.8 U/mL和31.5 U/mL,发酵终点pH分别为5.1和5.0,两者均能有效地降解棉子糖,蛋白水解能力随着发酵时间的增加而增强。

**关键词:**乳酸菌;  $\alpha$ -半乳糖苷酶; 鉴定; 发酵特性

**中图分类号:**Q939.9      **文献标志码:**A

## Identification of $\alpha$ -galactosidase-producing lactic acid bacteria and their fermentation performance

CHEN Jun-liang, YANG Li-jie, HUO Gui-cheng\*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Two  $\alpha$ -galactosidase-producing strains were obtained from traditional indigenous dairy products. Based on morphological identification, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, these two  $\alpha$ -galactosidase-producing strains were identified as *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*, and coded as LB21 and KLDS2.0509, respectively. Soymilk was fermented with each strain and  $\alpha$ -galactosidase activities, production of organic acid, metabolism of oligosaccharides and proteolytic enzymes were assessed during 48 h incubation at 37 °C. LB21 and KLDS2.0509 exhibited variable  $\alpha$ -galactosidase activities, of which the highest activities were 26.8 U/mL and 31.5 U/mL, and pH values were 5.1 and 5.0 at the end of fermentation respectively. Both LB21 and KLDS2.0509 could effectively degrade soymilk raffinose. The hydrolysis of protein increased with an extension of fermentation time.

**Key words:** lactic acid bacteria;  $\alpha$ -galactosidase; identification; fermentation performance

## 0 前言

豆乳中存在棉子糖族低聚糖(raffinose family oligosaccharides, RFO),能引起消费者肠胃气胀,限制其在食品工业中的开发利用。RFO中的棉子糖和水苏糖属于大分子物质,不能被肠壁吸收,完整的低聚糖直接进入肠道,被肠道中的微生物菌群分解代谢,产

生CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>和少量的CH<sub>4</sub>,从而引起肠胃气胀,表现出反胃、痉挛、腹泻、腹部不适等症状<sup>[1]</sup>。

$\alpha$ -半乳糖苷酶( $\alpha$ -Galactosidase, EC 3.2.1.22),也称为蜜二糖酶,属外切糖苷酶类,特异性水解具有 $\alpha$ -半乳糖苷结构的碳水化合物,如蜜二糖、棉子糖和水苏糖等低聚糖<sup>[2]</sup>。在乳酸菌中,植物乳杆菌、发酵乳杆菌、短乳杆菌和布氏乳杆菌均能够将 $\alpha$ -半乳糖苷水解为易消化的碳水化合物<sup>[3]</sup>。因此,可以利用

收稿日期:2008-04-21

基金项目:国家“863计划”资助项目(2006AA10Z344)

作者简介:陈俊亮(1981-),男,博士研究生,研究方向为食品微生物。

\*通讯作者:霍贵成(1958-),男,教授,博士生导师,研究方向为乳品加工与食品微生物。Email:gchuo58@126.com

具有高 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性的乳酸菌,充分降解大豆乳清中引起肠胃气胀的 $\alpha$ -半乳糖基低聚糖,从而解决这个问题<sup>[4,5]</sup>。

本试验从传统乳制品来源的乳酸菌中筛选获得2株高产 $\alpha$ -半乳糖苷酶的菌株,并研究其生理生化特性,16S rRNA 基因序列分析,根据此确定产 $\alpha$ -半乳糖苷酶的菌株的种属。然后研究了乳酸菌所产 $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶活力、产酸性能、降解棉子糖能力和蛋白水解能力,以评价产酶菌株的发酵性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株 LB21 和 KLDS2.0509 由乳品科学教育部重点实验室工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)分离纯化保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

MRS 培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母粉 5 g,葡萄糖 20 g,三水醋酸钠晶体 5 g,Tween 80 1 mL,柠檬酸三铵 2.0 g, $K_2HPO_4$  2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  0.05 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 L,pH 6.8。

碳水化合物发酵试验培养基:浙江省杭州天和微生物试剂有限公司生产的细菌微量生化反应管。棉子糖、*p*-nitrophenyl、*p*NPG (*p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside)、牛血清白蛋白均为 Sigma 公司产品;酵母粉、蛋白胨为 Oxiod 公司产品;其余试剂为国产分析纯。

紫外可见分光光度计(DU800);立式冷冻离心机(GL-21M);恒温培养箱(DHP-9082);Waters1525液相色谱仪(示差检测器);梅特勒-托利多 Delta320 pH 计;PCR 仪(AB 公司 9700);超净工作台。

### 1.3 产酶菌株的鉴定

#### 1.3.1 菌株形态学观察及生理生化特性鉴定

菌株 LB21 在 37 °C 培养 12 h,进行革兰氏染色、荚膜染色,在光学显微镜下观察形态。菌株的生理生化特性鉴定方法参照文献[6]。

#### 1.3.2 分子生物学鉴定

PCR 扩增和序列分析:正向引物 16SF:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物 16SR:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3',由上海英骏生物技术有限公司合成<sup>[7]</sup>。

50  $\mu$ L PCR 反应体系为:ddH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu$ L,10  $\times$  PCR buffer (plus Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L,2.5 mmol/L Mixture dNTP 4  $\mu$ L,50 pmol/ $\mu$ L 引物 A 和 B 各 1  $\mu$ L,模板 DNA 2  $\mu$ L,TaKaRa LA Taq(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L。PCR 反应条件为:

94 °C 4 min;94 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物检测、纯化回收,由上海生工生物公司完成测序。将菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 核酸序列数据库中的序列进行比对,采用 CLUSTALX 软件进行同源性分析,基于 16S rDNA 的同源性,使用 MEGA4 软件中的 Neighbour-Joining 法构建系统发育树<sup>[8]</sup>。

### 1.4 $\alpha$ -半乳糖苷酶活力测定

#### 1.4.1 粗酶液制备

产酶菌株在 MRS 培养基中连续传代 2 次,5% (v/v)活化发酵剂接种于 200 mL 添加 1% 葡萄糖和 1% 棉子糖的 MRS 肉汤培养基中,0KLDS2.0509 和 LB21 分别在厌氧和有氧条件下 37 °C 培养 48 h。在发酵 12、24、36、48 h 时,无菌条件下分别取出 50 mL 菌液,保存于 4 °C 冰箱中。从中取出 10 mL 菌液以 6 000 g 离心 10 min 收集菌体,用 20 mL 预冷的 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 5.5)清洗细胞沉淀,接着 6 000 g 离心 10 min,重复以上清洗操作。然后用 10 mL 相同的缓冲液悬浮细胞沉淀,置于冰中,超声波破碎(间歇破碎 80 次,工作时间 3 s,间隔 4 s),最后 12 000 g 离心 30 min 除去细胞碎片,上述所有离心操作都在 4 °C 进行,上层清液用作天然酶提取物<sup>[9,10]</sup>。

#### 1.4.2 酶活力测定

250  $\mu$ L 酶液与 500  $\mu$ L 5 mmol/L 的 *p*NPG 混合,在 37 °C 温育 30 min,添加 500  $\mu$ L 的 0.2 mol/L 碳酸钠终止反应,在 420 nm 下测定其 OD 值,以 *p*-硝基酚的生成量表示酶活力。酶活力单位(U/mL)定义为:在测定条件下每分钟释放 1  $\mu$ mol 的 *p*-硝基酚所需的酶量<sup>[11]</sup>。

### 1.5 产酶菌株的发酵性能评价

#### 1.5.1 低聚糖降解能力测定

5 mL 样品以 14 000 g 离心 30 min 除去蛋白质,接着用 0.22  $\mu$ m 膜滤器过滤。棉子糖浓度使用 Waters1525 高效液相色谱仪测定。色谱条件:示差折光检测器;氨基色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm);流动相: $V_{乙腈}:V_{水} = 75:25$ ;流速:1 mL/min;柱温:30 °C;进样量:10  $\mu$ L。低聚糖浓度通过标准曲线确定并以每 100 mL 样品中糖的毫克数表示<sup>[3,11]</sup>。

#### 1.5.2 产酸能力测定

在菌株生长期间,在发酵 0、12、24、36、48 h 时使用 pH 计测定发酵豆乳的 pH 值。

#### 1.5.3 蛋白水解能力测定

在发酵期间菌株的蛋白水解作用通过 *o*-酞二醛(OPA)法测定自由氨基来确定。3 mL 发酵豆乳与 0.75% 的三氯乙酸混合,经过滤器过滤,过滤液与

3 mL OPA 试剂混合,室温放置 2 min。使用分光光度计测定溶液在 340 nm 下的吸光值。微生物的相对蛋白水解活性用自由氨基的吸光值表示,用未处理豆浆作为空白对照,每个 TCA 过滤液取 3 组样品进行分析<sup>[4]</sup>。

### 1.6 统计分析

所有数据均为 3 个重复样品的平均值,采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,判断之间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 产酶菌株的鉴定结果

#### 2.1.1 形态学特征及生理生化鉴定结果

菌株 LB21 为革兰氏阳性菌,菌体呈短杆状,两端钝圆,单个或链状排列,无芽孢,无鞭毛,无荚膜。

菌落形态表现为圆形、乳白色、不透明、中间凸起、边缘光滑。菌株 KLDS2.0509 为革兰氏阳性菌,菌体呈长而稍弯曲状,个别为短杆较规则型,单个或者 V 形排列,不形成芽孢,无运动性。菌落光滑、凸圆、边缘完整、乳白色并具有柔软的质地,如图 1 所示。

菌株 LB21 能利用葡萄糖产酸产气,能利用牛奶产酸并使之凝固,葡糖酸盐水解试验、MR 试验为阳性,不能水解淀粉,不产生 H<sub>2</sub>S 和色素,V-P 试验为阴性;能利用阿拉伯糖、纤维二糖、果糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、蜜二糖、棉籽糖、海藻糖、蔗糖、甘露糖。菌株 KLDS2.0509 能够发酵利用阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、蜜二糖、棉子糖、松三糖、鼠李糖,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶试验、H<sub>2</sub>S 试验、吡啶试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验、柠檬酸盐试验、葡糖酸盐试验均为阴性。

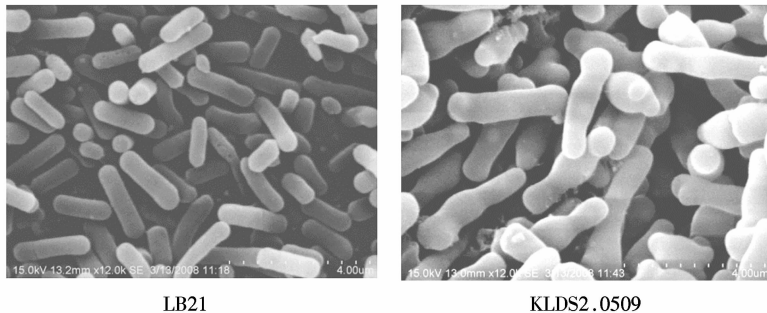


图 1 菌株 LB21 和 KLDS2.0509 的电镜扫描图片(×12 000)

Fig.1 Scanning electron micrograph (SEM) of strain LB21 and KLDS2.0509(×12 000)

根据形态学特征和生理生化鉴定结果,对照《伯杰细菌鉴定手册》,菌株 LB21 与发酵乳杆菌属特征

相似,菌株 KLDS2.0509 与长双歧杆菌属特征相似<sup>[12]</sup>。菌株的生理生化特性见表 1。

表 1 菌株的生理生化鉴定

Table 1 Physiological and biochemical properties of strains

试验项目	KLDS2.0509 结果	LB21 结果	碳源发酵试验	KLDS2.0509 结果	LB21 结果
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 酶试验	-	-	阿拉伯糖(ARA)	+	+
H <sub>2</sub> S 产生试验	-	-	葡萄糖(GLU)	+	+
温度试验	15℃	+	半乳糖(GAL)	+	+
	45℃	-	果糖(FRU)	+	+
吡啶试验	-	-	甘露糖(MDM)	-	+
明胶液化试验	-	-	乳糖(LAC)	+	+
硝酸盐还原试验	-	-	蔗糖(SAC)	+	+
石蕊牛乳	还原	+	麦芽糖(MAL)	+	+
	凝固	+	蜜二糖(MEL)	+	+
	产酸	+	棉籽糖(RAF)	+	+
	胨化	-	松三糖(MLZ)	+	-
柠檬酸盐试验	-	-	纤维二糖(CEL)	-	+
葡糖酸盐试验	-	+	甘露醇(MAN)	-	-
淀粉水解	-	-	山梨醇(SOR)	-	-
MR 试验	+	+	木糖(XYL)	-	+
V-P 试验	-	-	七叶灵(ESC)	+	-
精氨酸产 NH <sub>3</sub>	+	+	苦杏仁苷(AMY)	+	-
色素产生	-	-	海藻糖(TRE)	-	+
			鼠李糖(RHA)	+	-

注:“+”表示 90% 以上为阳性;“-”表示 90% 以上为阴性。

### 2.1.2 分子生物学鉴定结果

菌株 LB21 和 LDS2.0509 16S rRNA 基因的有效长度分别为 1 485 bp 和 1 518 bp, 将 2 株菌的 16S rRNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比较, 从中选择与亲缘关系最近的 12 个菌株的 16S

rRNA 序列与其构建系统发育树, 如图 2 所示。菌株 LB21 与 *Lactobacillus fermentum* 位于同一分支中, 同源性最高。菌株 KLDS2.0509 与标准菌株 *Bifidobacterium longum* 位于同一分支中, 同源性最高, 表明其与 *Bifidobacterium longum* 的亲缘关系最近。

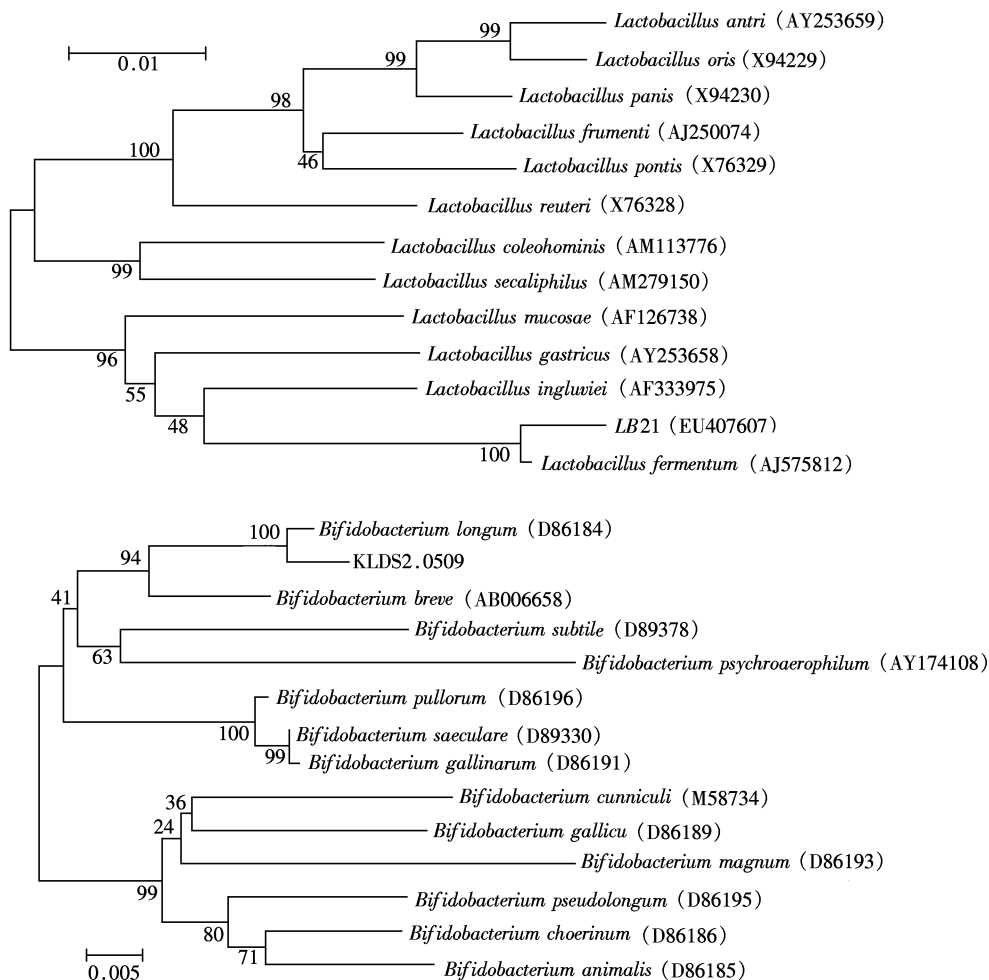


图 2 菌株 LB21 和 LDS2.0509 的系统发育树

Fig.2 Hylogenetic tree of strains LB21 and S2.0509 and other isolated strains based on 16S rDNA sequences

## 2.2 产酶菌株的发酵性能研究

### 2.2.1 产酸能力

豆乳中碳水化合物被乳酸菌利用产生有机酸, 主要是乳酸和乙酸。两菌株表现出不同产酸能力, 有机酸生成量随着发酵时间延长而增加, 如图 3 所示。KLDS2.0509 表现出最高产酸性能, 其样品 pH 降低至 5.0。菌株 LB21 也表现出较高产酸能力, 发酵终点时豆乳样品 pH 达到 5.1。2 株经 48 h 培养后菌数均达到  $10^8$  cfu/mL, 由于其自身产生  $\alpha$ -半乳糖苷酶, 能利用蔗糖、棉子糖、水苏糖以及其它碳水化合物作为能量来源, 促进了细胞在培养期间更好生长。所有样品中有机酸生成量随着发酵时间增加而显著提高, 特别是在对数生长期, pH 显著下降, 因此豆乳具有作为某些乳酸菌生长培养基的潜力。

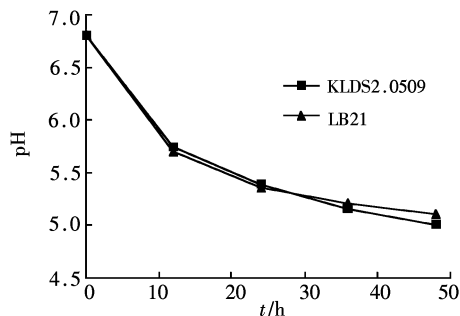


图 3 发酵期间样品的 pH 变化

Fig.3 Changes of pH in samples during fermentation

### 2.2.2 产酶能力

2 株菌株培养期间所产  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活力变化如图 4 所示。菌株在不同生长阶段表现出不同的  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力, 在对数生长期所有菌株的酶活

力显著提高,经 24 ~ 32 h 培养后均达到最高酶活力,并且在稳定期保持相对平稳的酶活力水平。双歧杆菌菌株酶活力水平明显高于乳酸杆菌菌株,其中菌株 KLDS2.0509 表现出最高酶活力水平 ( $P < 0.05$ ),达到 31.5 U/mL;菌株 LB21 也表现出较高酶活力,酶活力为 26.8 U/mL。菌株 KLDS2.0509 和 LB21 在对数生长期酶活力水平升高显著,表明 2 株菌分解棉子糖产生有机酸的能力较强。

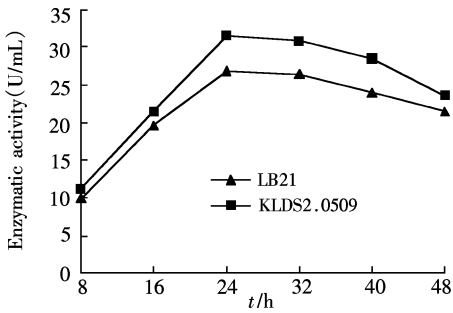


图 4 发酵期间乳酸菌所产  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力变化  
Fig.4 Activity changes of  $\alpha$ -galactosidase produced by lactic acid bacteria during fermentation

### 2.2.3 棉子糖的降解能力

2 株菌株表现出不同的降解棉子糖能力,试验结果如图 5 所示。菌株 KDLS2.0509 代谢棉子糖能力最强,随着发酵时间的增加,持续降解棉子糖,发酵终点时豆乳中棉子糖质量浓度达到 3.2  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.05$ );LB21 也表现出较高代谢水平,发酵终点棉子糖含量降低了 87.9%。实验结果表明,产酶菌株降解棉子糖能力与所产  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力水平直接相关,酶活力水平越高,降解棉子糖能力越强。

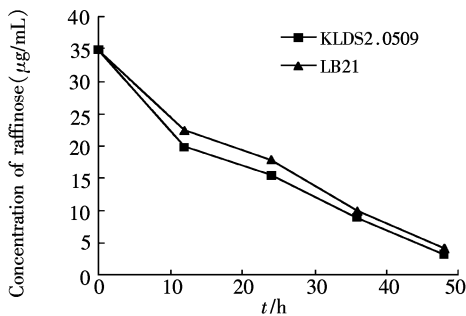


图 5 发酵期间发酵罐样品中棉子糖质量浓度的变化  
Fig.5 Changes of raffinose concentration in fermenter during fermentation

### 2.2.4 蛋白水解能力

菌株在豆乳中的蛋白水解能力变化,如图 6 所示,不同菌株显示出不同蛋白水解活力水平,并随着发酵时间的增加,蛋白水解程度逐渐升高。KLDS2.0509 和 LB21 样品中自由氨基酸和肽类生成量在 0 ~ 12 h 期间增加缓慢 ( $P > 0.05$ ),而在 12 ~ 24 h 期间样品中自由氨基酸和肽类生成量显著增加 ( $P < 0.05$ ),均表现出较高的蛋白水解活力。实验结果表

明,蛋白水解活性的高低依赖于菌株类型和发酵时间。产酶菌株能够利用某些氨基酸和肽类来促进细胞生长,因此,具有高蛋白水解能力的益生菌在豆乳中具有更好生长性能和更高活菌数。

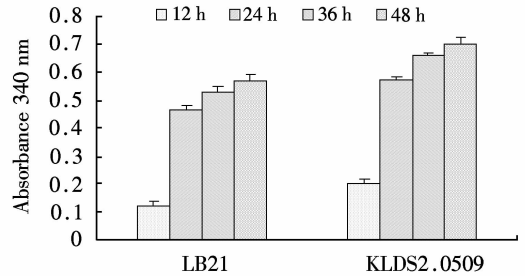


图 6 发酵期间豆乳中蛋白水解程度  
Fig.6 The extent of proteolysis in soymilk during fermentation

## 3 结论

本试验从传统乳制品来源的乳酸菌中筛选获得 2 株高产  $\alpha$ -半乳糖苷酶的菌株,根据菌株形态和生理生化特性以及 16S rRNA 基因序列分析,鉴定为发酵乳酸杆菌和长双歧杆菌。在豆乳中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 期间,2 菌株 LB21 和 KLDS2.0509 表现出不同酶活力水平,其最高酶活力分别达到 26.8 U/mL 和 31.5 U/mL;2 菌株具有较高的产酸能力,发酵终点时发酵液 pH 分别降低至 5.1 和 5.0;产酶菌株降解棉子糖能力与所产  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力水平直接相关,2 菌株均能有效降解棉子糖,菌株 KLDS2.0509 降解棉子糖能力最高,发酵终点时豆乳中棉子糖浓度降至 3.2  $\mu\text{g/mL}$ ;此外,2 株乳酸菌均表现出较高的蛋白水解活力,蛋白水解活性的高低依赖于菌株类型和发酵时间,具有高蛋白水解能力的菌株在豆乳中具有更好生长性能和更高活菌数。

本实验筛选出的乳酸菌具有优良的发酵性能和较高的产酶能力,能显著降解豆制品中的棉子糖。但是,菌株低 pH 耐受性、高温下热稳定性较差,需要进一步改善。2 菌株均属于食品级益生菌,具有良好安全性,不仅能够应用于新型豆制品的开发,而且可降解豆粕饲料中不易消化的大豆低聚糖,用于饲料工业,提高饲料利用率。所选菌株在食品工业和饲料工业中具有广阔的应用前景。

### 参考文献:

[1] CRISTOFARO E, MATTU F, WUHRMANN J J. Sugars in nutrition[M]. New York: Academic Press, 1974.  
[2] NAUMOFF D G. Phylogenetic analysis of  $\alpha$ -galactosidases of the GH27 family[J]. Molecular Biology, 2004, 38:388-399.

(上接第32页)

- [3] SCALABRINI P, ROSSI M, SPETTOLI P, et al. Characterization of bifidobacterium strains for use in soymilk fermentation. [J] International Journal of Food Microbiology, 1998, 39: 213-219.
- [4] DONKOR O N, HENRIKSSON A, VASILJEVIC T, 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.
- [5] KAMALY K M. Bifidobacteria fermentation of soybean milk [J]. Food Research International, 1997, 30: 675-682.
- [6] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [7] MAURO S, DIEGO M, SILVIA C, et al. Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium* strains[J]. Curr Microbiol, 2002, 45: 24-29.
- [8] ANTARA N S, SUJAYA I N, YOKOTA A, et al. Identification and succession of *Lactic acid bacteria* during fermentation of 'urutan', a Balinese indigenous fermented sausage [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2002, 18(3): 255-262.
- [9] SCALABRINI P, ROSSI M, SPETTOLI P, et al. Characterization of bifidobacterium strains for use in soymilk fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 39: 213-219.
- [10] TSANGALIS D, SHAH N P. Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39: 541-554.
- [11] DONKOR O N, HENRIKSSON A, VASILJEVIC T, et al.  $\alpha$ -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk [J]. Food Chemistry, 2007, 104: 10-20.
- [12] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984.

(编辑: 于善清)