

转糖基 β -半乳糖苷酶产生菌 *Enterobacter agglomerans* B1: 筛选鉴定、发酵产酶及其合成低聚半乳糖的研究

卢丽丽, 肖敏*, 徐晓东

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250100)

摘要: 从土壤中筛选获得一株具有转糖基活性的 β -半乳糖苷酶产生菌, 综合其形态学特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列同源分析结果, 将其鉴定为成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)B1。通过单因子试验和正交试验, 对 B1 菌株产转糖基 β -半乳糖苷酶的培养条件进行了优化。最佳培养基主要组份为: 乳糖 1%, 酵母粉 1%, 蛋白胨 0.5%; 发酵条件为: 初始 pH7.5, 发酵温度 25°C, 发酵时间 26 h。在该培养条件下产酶量为 9.7U/mL。利用薄层层析技术研究了 pH、温度、底物浓度和反应时间对该菌株全细胞以乳糖为底物生成低聚半乳糖的影响, 确定最适反应条件为: pH7.5 缓冲液配制的 30%乳糖溶液; 50°C 反应 12h。最优化反应的转糖基产物经 HPLC、TLC 和 MS 分析, 确定低聚半乳糖产量为 40.7%, 组分为转移二糖、三糖和四糖。

关键词: 成团肠杆菌; 鉴定; 转糖基 β -半乳糖苷酶; 发酵条件; 低聚半乳糖

中图分类号: Q935, Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)01-0038-07

β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, EC 3.2.1.23), 又称乳糖酶, 广泛存在于动物、植物和微生物中, 能水解乳糖生成半乳糖和葡萄糖, 在食品工业中有着广泛的应用, 1998 年被中国食品添加剂标准化委员会列为食品添加剂新品种, 用于水解牛乳和其它乳制品中的乳糖, 解决乳糖不耐症患者的乳品消费问题等等^[1]。

某些种类的 β -半乳糖苷酶由于具有构型保持酶作用机制, 在水解乳糖分子的同时, 还具有转半乳糖基作用, 即以乳糖或其水解产物半乳糖和葡萄糖为糖基受体, 生成半乳糖苷键, 被用于合成功能性低聚半乳糖(galacto-oligosaccharide, GOS)^[2]。GOS 是众多低聚糖中令人瞩目的一种, 是目前各类功能性低聚糖品种中唯一源自动物乳汁中的一类, 并且在提高双歧杆菌数量、降低梭菌数量、产生较多短链脂肪酸、产生较少气体等方面具有突出的优点^[3]。

近年来还研究发现, GOS能作为受体类似物阻碍病原菌结合到肠道上皮细胞^[4]; 能阻遏肠道苯酚的产生及其在血清中的积累, 提高肾衰竭病人的生命质量^[5]; 能降低婴幼儿遗传性过敏症的发生率等等^[6]。目前国际上商品化GOS是用微生物酶法, 即利用微生物 β -半乳糖苷酶以乳糖为原料生产。但不同微生物来源的 β -半乳糖苷酶的水解活性和半乳糖基转移活性的比例不同, 如大肠杆菌(*Escherichia coli*)等所产生的 β -半乳糖苷酶具有较强的水解活性; 而米曲霉(*Aspergillus oryzae*)等所产生的 β -半乳糖苷酶则具有较强的半乳糖基转移活性^[2]。目前, 寻求新的高效的可应用于GOS合成的微生物酶源是国际上研究的热点^[7~13], 但国内相关方面的研究较少^[14~17], 还局限在实验室规模, 有的还在使用进口酶制剂^[16]。

另一方面, 近年来随着糖生物学的发展, 转糖基 β -半乳糖苷酶逐渐成为糖类合成的重要工具酶之

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA713B04-06); 国家“863 计划”(2006AA10Z338)

*通讯作者。Tel: +86-531-88365128; Fax: +86-531-88565610; E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

作者简介: 卢丽丽(1979-), 女, 湖北襄樊人, 讲师, 主要从事微生物糖苷酶合成糖类研究。E-mail: graduate531@163.com

收稿日期: 2007-05-14; 修回日期: 2007-07-25

一。其广泛的受糖体底物特异性使其在糖类合成中备受关注, 被用于合成多种多样的半乳糖苷化合物(galactose-containing chemicals, GCC)^[18-25], 如合成烷糖苷类表面活性剂^[25]、对抗生素进行糖基化修饰^[18]等等。这些化合物在食品业、工业、制药业等领域有着重要的应用价值。由于不同来源的 β -半乳糖苷酶的区域选择性不同, 并且目前应用于GCC合成的酶类有限, 因此有必要寻求新的转糖基 β -半乳糖苷酶来源。

本实验室从土壤中筛选到一株产高效转糖基 β -半乳糖苷酶的成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)B1, 为 GOS 生产提供了新的酶源。该菌株营养要求较简单, 环境适应能力强, 具有很好的开发应用前景。本文对该菌株产酶条件进行了优化, 并应用冻融全细胞作为酶源生产 GOS, 为进一步研究该菌株产生的转糖基 β -半乳糖苷酶的糖苷合成活性(如合成 GCC)等奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基: 本实验所用的产转糖基 β -半乳糖苷酶成团肠杆菌B1是从土壤中筛选获得。种子培养基(% w/v): 乳糖 1, 蛋白胨 0.5, 酵母粉 0.5, NaCl 0.5, 调pH7.0; 发酵液体培养基(% w/v): 无机盐溶液 I: CaCl₂ 0.011, MnSO₄ 0.0001; MgSO₄·7H₂O 0.03, KH₂PO₄ 0.005, FeSO₄·7H₂O 0.003, 调pH7.0 (其他成分在优化培养时注明)。进行条件优化时, 从液体种子按 1%(v/v)接种量接入发酵培养基, 37 °C培养 20 h。

1.1.2 试剂和仪器: Oligomate 55[®]由日本京都大学农学部应用分子微生物学熊谷英彦教授提供; 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, ONPG), Sigma公司产品; 薄层层析(TLC)板Silica gel 60 No.553, Merck公司产品; 岛津高效液相色谱LC-10A、RID-10A视差检测器; 糖分析柱 Aminex HPX-42A(300mm×7.8mm)和分离柱Bio-gel P2 (100cm×1.6cm), Bio-Rad公司产品。

1.2 产转糖基 β -半乳糖苷酶菌株的筛选

将土壤样品加入以乳糖为唯一碳源的培养液中, 于 37 °C富集培养 24h, 然后用无菌水将其进行梯度稀释, 均匀涂布于乳糖筛选平板上, 所获纯培养物按文献^[14]筛选水解活性和转糖基活性。

1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增

PCR 扩增采用细菌 16S rDNA 通用引物: 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1541r (5'-

A AGGAGGTGATCCAGCC-3')。PCR 反应采用 50 μ L 体系。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30s, 50 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 30 个循环。PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化 *E. coli* Top10。重组质粒由山东大学测序部进行测序, 所得序列通过 BLASTN 程序进行同源分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。

1.4 β -半乳糖苷酶水解活性测定

湿菌体 50mg, 加入 2mmol/L 的 ONPG 溶液 450 μ L, 40 $^{\circ}$ C 反应 10min, 加 1mL Na₂CO₃溶液终止反应, 离心, 上清液测 OD₄₀₀。活力单位规定: 以 1 分钟水解 ONPG 释放 1 μ mol 邻硝基苯酚的酶量为一个酶活力单位(U)。

1.5 正交试验设计

根据正交实验设计助手 IIV3.1 设计试验、分析结果。

1.6 β -半乳糖苷酶转糖基反应优化

湿菌体 50 mg, 加入 50 μ L 缓冲液冻融 3 次, 然后与 300 μ L 乳糖溶液进行以下转糖基反应: ①取冻融湿菌体与不同 pH 缓冲液(pH3~11)配制的 30%(w/v) 乳糖溶液混合, 于 50 $^{\circ}$ C 反应 4h, 研究 pH 对 GOS 产生的影响; ②取冻融湿菌体与 pH7.5 的 30%的乳糖溶液混合, 于不同温度(30 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C)条件下反应 4h, 研究温度的影响; ③取冻融湿菌体与不同浓度(10%~50%)的乳糖溶液(pH7.5), 于 50 $^{\circ}$ C 反应 4h, 研究乳糖起始浓度的影响; ④取冻融湿菌体与 30%的乳糖溶液(pH7.5)于 50 $^{\circ}$ C 反应, 不同时间取样, 研究反应时间的影响。所有样品于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min 终止反应, 通过 TLC 分析低聚糖产量。对最优反应的转糖基产物进行 HPLC 和 MS 分析。

1.7 转糖基产物的分析

1.7.1 TLC 分析: TLC 薄板点样后, 在展层剂(正丁醇:乙醇:水=5:3:2)中展层, 雾喷显色剂(20%硫酸溶液 + 0.5%的 3,5-二羟基甲苯), 于 120 $^{\circ}$ C 烘烤 10 分钟, 糖斑点显色。将薄板扫描后通过软件 ImageJ v1.28(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)进行定量分析。

1.7.2 HPLC 分析: 转糖基产物用 0.2 μ m 滤膜过滤后, 稀释成 5%的糖溶液, 进样分析。流动相为三蒸水, 流速为 0.2mL/min, 柱温 80 $^{\circ}$ C; 结果分析软件为 Class-VP6.0。

1.7.3 MS 分析: 转糖基产物通过 Bio-gel P2 柱层析进行初步分离, 三蒸水洗脱, 流速 0.5mL/min, 获得不同分子量的糖样品, 然后由山东大学药学院进行质谱分析, API 4000 质谱仪(Applied Biosystems MDS Sciex, Toronto, Canada), Turbo Spray。

2 结果

2.1 产转糖基 β -半乳糖苷酶菌株的筛选及鉴定

通过筛选水解活性和转糖基活性, 从土壤样品中分离获得 5 株菌产转糖基 β -半乳糖苷酶, 对其中一株转糖基效率较高的编号为 B1 的菌株进行了菌种鉴定。

2.1.1 形态学与生理生化特征: 菌株 B1 在 LB 培养基上形成圆形菌落, 边缘不整齐, 表面光滑, 有光泽; 菌体杆状, 革兰氏染色阴性, 大小为(0.5~1) μm \times (1~3) μm , 以周生鞭毛运动, 不形成芽孢。菌株 B1 的生理生化特征见表 1。

表 1 菌株 B1 的生理生化特征
Table 1 Physiological characteristics of the strain B1

Characteristics	B1	Characteristics	B1
Oxidase	-	Nitrate reduction	+
Catalase production	+	Gelatin hydrolysis	-
Indole production	-	D-Xylose	+
Methyl red	+	Sucrose	+
Voges-Proskauer	+	Maltose	+
Citrate (Simmons)	-	Trehalose	+
Urea hydrolysis	-	D-Mannose	+
Lysine decarboxylase	-	L-Rhamnose	+
Ornithine decarboxylase	-	D-Mannitol	+
Arginine dihydrolase	-	L-Arabinose	+
D-Glucose, acid production	+	D-Sorbitol	+
D-Glucose, gas production	-	Glycerol	+

+, positive; -, negative

2.1.2 16S rDNA 克隆及其序列分析: PCR 扩增获得菌株 B1 的 16S rDNA 核苷酸片断, 大小为 1532bp, GenBank 注册号为 DQ133596。同源序列比对结果表明, 该序列与肠杆菌属多个菌株已发表的 16S rDNA 序列(如 DQ279308 和 DQ279307)的相似性达 99%以上。

根据文献[26], 综合 B1 菌株的形态学特征、生理生化特征及 16S rDNA 核苷酸序列同源性分析结果, 将菌株 B1 鉴定为成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)。

2.2 *E. agglomerans* B1 产转糖基 β -半乳糖苷酶的条件优化

2.2.1 培养基组份的单因子试验: 将发酵培养基中其他成分固定为无机盐溶液 I, 蛋白胨 0.5%, 酵母粉 0.5%, pH7.0, 然后分别加入不同碳源(乳糖、葡萄糖、半乳糖)及其组合, 碳源总浓度为 1%。结果表明, 乳糖为唯一碳源时, 产酶量最高; 不加乳糖时,

几乎不产酶或产酶量很低。在 0.5%~5%浓度范围内, 1%浓度的乳糖产酶量最高。将发酵培养基中其他成分固定为无机盐溶液 I, 乳糖 1%, pH7.0, 分别加入不同氮源(尿素、硝酸钠、硫酸铵、蛋白胨、酵母粉、牛肉膏)及组合, 氮源总浓度为 1%。结果表明, 酵母粉为唯一氮源与酵母粉、蛋白胨为复合氮源时的产酶量均很高。在 0.5%~4%浓度范围内, 1%浓度的酵母粉产酶量最高。

2.2.2 培养基组份的正交实验: 选取乳糖、蛋白胨和酵母粉 3 个因子, 采用 5 因素 4 水平的正交表 $L_{16}(4^5)$ 设计实验。优化条件的因素水平见表 2, 具体结果见表 3。根据表 3 的极差(ΔK)分析结果可以得知, β -半乳糖苷酶产量的影响因子排序为: 乳糖 > 酵母粉 > 蛋白胨。最优化组合为: 乳糖 1%, 酵母粉 1%, 蛋白胨 0.5%。

表 2 因素水平表
Table 2 Level of factors in $L_{16}(4^5)$ orthogonal test

Level	Lactose /%	Peptone /%	Yeast extract /%
1	0.5	0	0.5
2	1	0.5	1
3	1.5	1	1.5
4	2	1.5	2

表 3 正交试验结果的极差分析
Table 3 Range analysis of orthogonal test

No.	Lactose	Peptone	Yeast extract	β -galactosidase / (U/mL)
1	1	1	1	3.913
2	1	2	2	4.622
3	1	3	3	4.574
4	1	4	4	4.151
5	2	1	2	5.004
6	2	2	1	5.202
7	2	3	4	4.651
8	2	4	3	4.242
9	3	1	3	4.433
10	3	2	4	4.181
11	3	3	1	4.509
12	3	4	2	4.712
13	4	1	4	4.346
14	4	2	3	4.503
15	4	3	2	4.621
16	4	4	1	4.272
K1	4.315	4.424	4.474	
K2	4.775	4.627	4.740	
K3	4.459	4.589	4.438	
K4	4.436	4.344	4.332	
ΔK	0.460	0.283	0.408	

2.2.3 摇瓶发酵条件优化：选择 2.2.2 获得的最优培养基，即乳糖 1%，酵母粉 1%，蛋白胨 0.5%，在所测的初始 pH 6.5~9.5 的范围内，pH7.0~9.0 产酶量较高，其中 pH 7.5~8 的产酶量最高；在所测的 20℃~45℃ 的温度范围内，20℃~37℃ 均能较好地产酶，在 25℃ 时的产酶量最高。选择 2.2.2 获得的最优培养基，初始 pH 为 7.5，在 25℃ 培养 B1 菌株，每隔一定时间取样测定菌体生长量和产酶量。如图 1 所示，β-半乳糖苷酶酶量在 26h 时，达到最高值 9.7U/mL，之后呈下降趋势。菌体生长量此时为 19.0g/L，到 38h 时达到最大值，之后呈缓慢降低趋势。

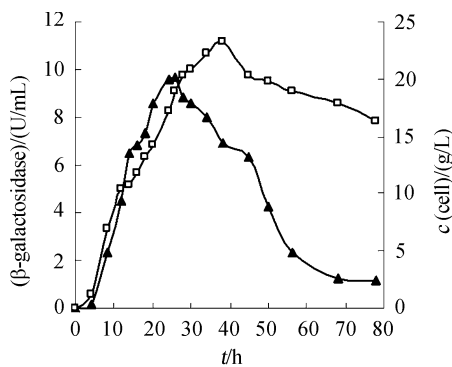


图 1 *E. agglomerans* B1 的生长曲线(□) 和产酶曲线(▲).
Fig. 1 Time courses of cell growth (□) and enzyme production (▲) from *E. agglomerans* B1.

2.3 *E. agglomerans* B1 全细胞以乳糖为底物的转糖基反应

2.3.1 转糖基反应优化：采用最优培养基和最优发酵条件培养 *E. agglomerans* B1，收集菌体，冻融后按 1.6 所述方法进行转糖基反应。结果表明，全细胞合成 GOS 的最适 pH 为 7.5，最适反应温度为 50℃。

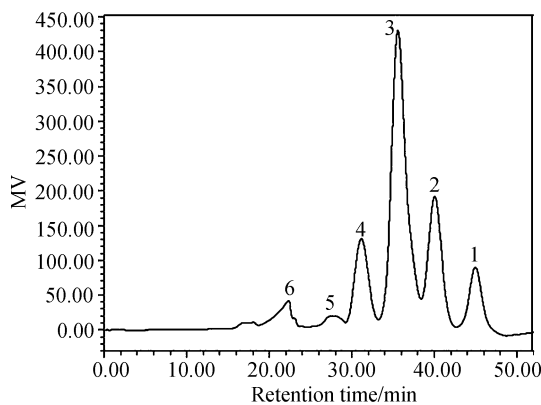


图 2 转糖基反应的 HPLC 分析
Fig. 2 HPLC analysis of the transgalactosylation reaction. 1. galactose; 2. glucose; 3. disaccharides including lactose and TD;

peak 4 to 6. TOS.

在此条件下，当乳糖浓度为 30%、反应时间为 12h 时，低聚糖产量达到最大值。图 2 显示了转糖基反应的 HPLC 分析结果，转糖基产物组成为半乳糖 9.5%、葡萄糖 19.6%、乳糖和转移二糖(transgalactosylated disaccharides, TD)46.6%、三糖以上的转移低聚糖(transgalactosylated oligosaccharides, TOS) 24.3%，峰 3 包括乳糖和转移二糖，未能分离。在 TLC 结果中(图 3)，半乳糖斑点与乳糖斑点之间的新糖斑点为转移二糖，乳糖斑点以下也存在转移二糖斑点，扫描结果显示低聚半乳糖(TD+TOS)的总含量为 40.7%。结合液相分析结果，相应的转移二糖含量为 16.4%，乳糖含量为 30.2%。

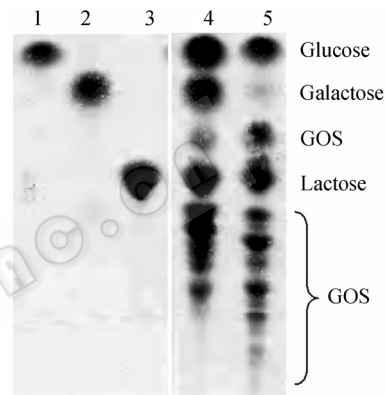


图 3 转糖基反应的 TLC 分析

Fig. 3 TLC analysis of the transgalactosylation reaction. 1. glucose; 2. galactose; 3. lactose; 4. transgalactosylation products by B1; 5. Oligomate 55®.

2.3.2 转糖基产物的分离分析：将 *E. agglomerans* B1 产生的转糖基产物用 Bio-gel P2 进行分离，然后对获得的不同分子量的样品(编号为 B1-11、B1-5、B1-1)进行质谱分析，结果见表 4，GOS 样品的组份为转移二糖、三糖和四糖。图 4 显示了三糖样品 B1-5 的质谱图，其相应的分子离子峰分析(m/z)见表 4。

表 4 低聚糖产物的 MS 结果

Table 4 The results of MS analysis of oligosaccharides

Samples	Molecular weight(M)	m/z	Results
B1-11	342	[M+1] ⁺ 343.4; [M+H ₂ O] ⁺ 360.5; [M+Na] ⁺ 365.5; [M+K] ⁺ 381.5	disaccharides
B1-5	504	[M+1] ⁺ 505.5; [M+H ₂ O] ⁺ 522.6; [M+Na] ⁺ 527.5; [M+K] ⁺ 543.6	trisaccharides
B1-1	666	[M+1] ⁺ 667.5; [M+H ₂ O] ⁺ 684.7; [M+Na] ⁺ 689.5; [M+K] ⁺ 705.6	tetrasaccharides

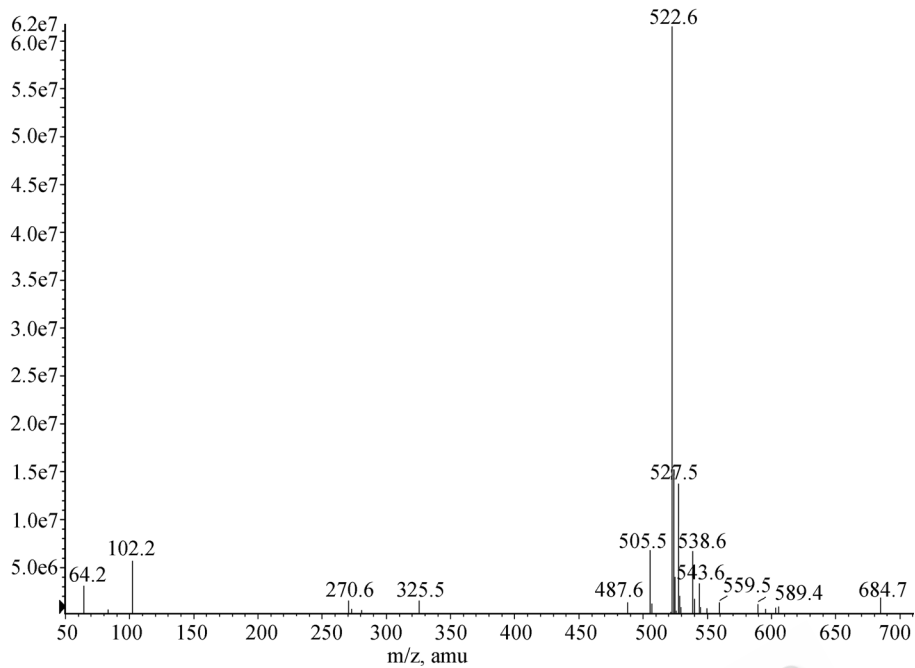


图4 样品 B1-5 的 MS 图谱

Fig. 4 MS analysis of the sample B1-5.

3 讨论

成团肠杆菌最早是从植物中分离获得,早在1888年就有对该菌群的描述。此后在各种各样的环境中均获得过该菌群,这些菌株被划分为13属27种,先后有几十种名词用来描述该菌群,最多时达56个名称。成团肠杆菌是一个比较异源的菌群,它的分类地位还没有最后确定,近年来将其中部分菌群重新命名为泛菌属,其中模式菌株为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)^[27]。目前在NCBI数据库中,已经将成团泛菌列为成团肠杆菌的正式菌名。成团肠杆菌群在医学、农业及遗传学上都具有重要的作用:在生物代谢途径方面,具有脱卤素、降解三硝酸甘油及将甘油转化为1,3-丙二醇的能力;在植物促生方面,可作为生防菌、能分泌植物激素、还具有溶磷、固氮作用等等^[27]。本论文发现了成团肠杆菌另一个新的用途,即产转糖基 β -半乳糖苷酶,可用于合成糖类,应用于糖生物学、糖生物化学和制药业等领域。

本论文采用冻融湿菌体作为生产低聚半乳糖的酶源。冻融菌体是一种简便有效的 β -半乳糖苷酶制备方法,省时省力而且无污染,不仅能简化工业化生产低聚半乳糖的工艺,还能大大节约成本,因而优于其它酶源——如纯酶及其它全细胞酶源:利用纯化酶进行反应,酶的纯化过程比较繁琐,耗时耗力,酶蛋白得率低;采用有机溶剂处理过的全细胞生产低聚半乳糖,残留的有机溶剂会对产品造成污

染;直接用未处理的细胞生产低聚半乳糖,反应时间长,而且产量低;采用细胞发酵的方法,即将细胞接种于乳糖培养基中培养获得低聚半乳糖,反应时间长,而且发酵液中有大量的微生物代谢产物及残留的培养基成分,不利于低聚半乳糖的分离纯化^[28]。

E. agglomerans B1生产的低聚半乳糖含量为40.7%,高于很多已报道的菌株的产量,如*Aspergillus oryzae*(32%)^[7]、*Kluyveromyces lactis*(31%)^[8]、*Penicillium simplicissimum*(30.5%)^[9]、*Bifidobacterium bifidum*(35%)^[10]、*Lactobacillus reuteri*(38%)^[11]、*Bifidobacterium longum*(32.5%)^[13]和*Bacillus megaterium*(25.7%)^[14]等。并且该菌产生的GOS组分主要为转移二糖、三糖和四糖,为短链低聚糖。据报道^[29],在商业上,短链低聚糖比长链低聚糖更适合作为食品添加剂,原因在于两个方面:一是短链低聚糖更易于被人体肠道双歧杆菌菌群代谢(尽管长链低聚糖更适合于其它哺乳动物的有益菌群代谢);二是短链低聚糖在产生短链脂肪酸方面更有效,而短链脂肪酸的产生是衡量功能性低聚糖产生“双歧因子”效应的主要方面。

综上所述,本论文筛选获得的成团肠杆菌B1是产转糖基 β -半乳糖苷酶新菌株,发酵培养基组成简单,发酵条件要求粗放,是一株很有生产潜力的菌株,其全细胞以乳糖为底物生产获得的GOS产量高,并且糖链短,潜在的应用价值大。目前该菌株已被成功地应用于50公斤级低聚半乳糖中试生产当中。另外,该菌株所产转糖基 β -半乳糖苷酶的纯化工作

也已经完成, 其合成GCC的研究正在进行当中。目前国际上已知的合成GCC的菌株主要还局限在环状芽孢杆菌和米曲霉^[18-23], 因此本论文筛选到的 *E. agglomerans* B1 不仅为生产GOS提供了新酶源, 同时也为合成GCC提供了新的酶源。

参 考 文 献

- [1] 李玉强, 王昌禄, 顾小波, 等. β -半乳糖苷酶的研究与应用. 中国食品添加剂(*China Food Additives*), 2001, 2: 30-34.
- [2] Mahoney RR. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chem*, 1998, 63(2): 147-154.
- [3] Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, et al. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol*, 2001, 91(5): 878-887.
- [4] Tzortzis G, Goulas AK, Gee JM, et al. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *J Nutr*, 2005, 135(7): 1726-1731.
- [5] Kawakami K, Makino I, Asahara T, et al. Dietary galacto-oligosaccharides mixture can suppress serum phenol and p-cresol levels in rats fed tyrosine diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005, 51(3): 182-186.
- [6] Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, et al. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(1): 192-198.
- [7] Iwasaki k, Nakajima M, Nakao S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymatic batch reaction using β -galactosidase. *Process Biochem*, 1996, 31: 69-79.
- [8] Foda ML, Lopez-Leiva MH. Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. *Process Biochem*, 2000, 35: 581-587.
- [9] Cruz R, Cruz VD, Belote JG, et al. Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. *Revista de Microbiologia*, 1999, 30: 265-271.
- [10] Tzortzis G, Goulas AK, Gibson GR. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, 68(3): 412-416.
- [11] Splechtna B, Nguyen TH, Steinbock M, et al. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(14): 4999-5006.
- [12] Nakkharat P, Haltrich D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with beta-glucosidase and beta-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *J Biotechnol*, 2006, 123(3): 304-313.
- [13] Hsu CA, Lee SL, Chou CC. Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(6): 2225-2230.
- [14] 王红妹, 肖敏, 李正义, 等. 转糖基 β -半乳糖苷酶产生菌筛选和鉴定及酶催化生成低聚半乳糖. 山东大学学报(*Journal of Shandong University*), 2006, 41(1): 133-139.
- [15] 袁绍鹏, 肖敏, 孙正, 等. 一株曲霉(*Aspergillus* sp. AF) β -半乳糖苷酶的转糖基活性的研究. 食品与发酵工业(*Food and Fermentation Industries*), 2003, 29(11): 31-34.
- [16] 归莉琼, 魏东芝, 崔玉敏, 等. 米曲霉 β -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖. 华东理工大学学报(*Journal of East China University of Science and Technology*), 1998, 24 (4): 422-426.
- [17] 陈少欣, 魏东芝, 胡振华, 等. 固定化嗜热脂肪芽孢杆菌合成低聚半乳糖. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2001, 41(3): 357-362.
- [18] Scheckermann C, Wagner F, Fischer L. Galactosylation of antibiotics using the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 20 (8): 629-634.
- [19] Giacomini C, Irazoqui G, Gonzalez P, et al. Enzymatic synthesis of galactosyl-xylose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, 19: 159-165.
- [20] Nieder V, Marx SP, Gallego RG, et al. Synthesis of nucleotide-activated disaccharides with β -galactosidase from *Bacillus circulans* and α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 21(4): 157-166.
- [21] Miyasato M, Ajisaka K. Regioselectivity in β -galactosidase-catalyzed transglycosylation for the enzymatic assembly of D-galactosyl-D-mannose. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68 (10): 2086-2090.
- [22] Zeng X, Uzawa H. Convenient enzymatic synthesis of a *p*-nitrophenyl oligosaccharide series of sialyl N-acetylactosamine, sialyl Le^x and relevant compounds. *Carbohydr Res*, 2005, 340 (16): 2469-2475.
- [23] Shimizu R, Shimabayashi H, Moriwaki M. Enzymatic production of highly soluble myricitrin glycosides using β -galactosidase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(4): 940-948.
- [24] Giordano A, Tramice A, Andreotti G, et al. Enzymatic syntheses and selective hydrolysis of O- β -D-galactopyranosides using a marine mollusc β -galactosidase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(1): 139-143.
- [25] Kuptsova OS, Kliachko NL, Levashov AV. Synthesis of alkyl glycosides, catalyzed by β -glycosidases in a reversed micelle system. *Bioorg Khim*, 2001, 27(6): 429-433.
- [26] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [27] 沈德龙, 冯永君, 宋未. 成团肠杆菌的生物功能多样性及其分类最新进展. 微生物学杂(*Journal of Microbiology*), 2002, 22 (1): 40-42.
- [28] Dombou M, Tomioka I, Tsurutani R, et al. Method for production of a growth factor for *Bifidobacterium* sp. US Patent: 5294546. 1994.
- [29] Cruz R, Cruz VAD, Belote JG, et al. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource Technol*, 1999, 70(2): 165-171.

***Enterobacter agglomerans* B1 producing β -galactosidase with transglycosylation activity: screening, identification, fermentation conditions, and galacto-oligosaccharides synthesis**

Lili Lu, Min Xiao*, Xiaodong Xu

(State Key Laboratory of Microbial Technology, National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Galacto-oligosaccharides (GOS) are promising non-digestible oligosaccharides recognized as prebiotics. Commercial GOS containing galactose as subunit, are synthesized from lactose using the galactosyl-transferase activity of β -galactosidase. A strain producing β -galactosidase with transglycosylation activity was screened from the soil. Phenotypic analysis including morphology and physiology characteristics and 16S rDNA sequence analysis were carried out. Based on taxonomy results, the strain was identified as *Enterobacter agglomerans* B1. Medium and fermentation conditions were optimized by single factor and orthogonal experiments. The enzyme reached 9.7 U/mL in the medium (pH 7.5) containing 1% lactose, 1% yeast extract, and 0.5% peptone when cultured at 25°C for 26 h. Effects of pH, temperature, lactose concentration, and reaction time on transgalactosylation by whole cells were studied. Yield of GOS reached 40.7% in 30% lactose (pH 7.5) at 50°C for 12 h, as analyzed by HPLC and TLC. The results of an MS analysis showed that GOS were composed of di-, tri-, and tetrasaccharides.

Keywords: *Enterobacter agglomerans*; identification; β -Galactosidase with transglycosylation activity; fermentation conditions; galacto-oligosaccharides

Supported by the 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2004BA713B04-06) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10Z338)

*Corresponding author. Tel: +86-531-88365128; Fax: +86-531-88565610; E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

Received: 14 May 2007/Revised: 25 July 2007

《微生物学报》对英文摘要的要求

(2007年10月修订)

1. 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。
2. 英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再投到编辑部。根据英文摘要、文中的图和表, 不懂中文的同行就可以了解论文概况。
3. 撰写要点: 凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。
 - (1) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点, 括号, 温度, 希腊字母等。
 - (2) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。
 - (4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。
 - (5) 摘要中不用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等。