

# 微泡菌 ALW1 重组 $\beta$ -半乳糖苷酶的异源表达和酶学性质

唐桂均<sup>1</sup>, 李鹤宾<sup>2</sup>, 朱艳冰<sup>1,3</sup>, 姜泽东<sup>1,3</sup>, 倪辉<sup>1,3</sup>, 李清彪<sup>1,3</sup>, 陈艳红<sup>1,3\*</sup>

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021) (2. 厦门医学院药理学系, 福建厦门 361023)

(3. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建厦门 361021)

**摘要:**  $\beta$ -半乳糖苷酶催化乳糖水解为葡萄糖和半乳糖, 是乳制品加工中重要的酶。该研究将微泡菌 ALW1 菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行异源表达和纯化, 研究其酶学性质。结果表明, 微泡菌 ALW1 的  $\beta$ -半乳糖苷酶属于 GH1 家族, 利用 Ni-NTA Agarose 亲和层析获得的重组  $\beta$ -半乳糖苷酶分子量约为 64 ku。重组酶的最适反应温度为 30 °C, 最适 pH 为 4.5。温度低于 25 °C、pH 4.0~5.0 条件下,  $\beta$ -半乳糖苷酶具有良好稳定性。重组  $\beta$ -半乳糖苷酶对 DTT、吐温 20 和吐温 80 具有良好的耐受性; 离子型去垢剂 SDS 和 CTAB 存在时,  $\beta$ -半乳糖苷酶几乎丧失活性。重组  $\beta$ -半乳糖苷酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 10.98 mmol/L 和 7.48 U/mg。结构模拟显示, 微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的催化酸/碱残基和亲核残基分别为 Glu186 和 Glu370。该研究为来自微泡菌 ALW1 的  $\beta$ -半乳糖苷酶在食品领域的应用奠定理论基础。

**关键词:** 微泡菌;  $\beta$ -半乳糖苷酶; 酶学性质; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2022)09-111-118

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1035

## Heterologous Expression and Enzymatic Properties of Recombinant

### $\beta$ -Galactosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1

TANG Guijun<sup>1</sup>, LI Hebin<sup>2</sup>, ZHU Yanbing<sup>1,3</sup>, JIANG Zedong<sup>1,3</sup>, NI Hui<sup>1,3</sup>, LI Qingbiao<sup>1,3</sup>, CHEN Yanhong<sup>1,3\*</sup>

(1.College of Marine Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China) (2.Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China) (3.Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Research Center of Food Bioengineering of Xiamen City, Xiamen 361021, China)

**Abstract:**  $\beta$ -Galactosidase, which catalyzes the hydrolysis of lactose into glucose and galactose, is one of the most important enzymes used in dairy processing. In this study, the  $\beta$ -galactosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1 was heterologously expressed and purified in *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the enzymatic properties of the purified enzyme were examined. The results showed that the  $\beta$ -galactosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1 belonged to the glycoside hydrolase (GH) family 1. The recombinant  $\beta$ -galactosidase obtained by Ni-NTA agarose affinity chromatography had a molecular weight of 64 ku. The optimal reaction temperature and pH of the recombinant  $\beta$ -galactosidase were 30 °C and 4.5, respectively. The  $\beta$ -galactosidase exhibited good stability when the temperature was lower than 25 °C and pH was in the range of 4.0~5.0. The recombinant  $\beta$ -galactosidase had good tolerance to DTT, Tween 20, and Tween 80. In the presence of ionic detergents, SDS and CTAB,  $\beta$ -galactosidase almost lost its activity. The catalytic constants  $K_m$  and  $V_{max}$  of the recombinant  $\beta$ -galactosidase were 10.98 mmol/L and 7.48 U/mg, respectively. Structure simulation studies revealed that the catalytic acid/base residue was Glu186 and the nucleophilic residue was Glu370 for the  $\beta$ -galactosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1. The results layed a theoretical foundation for the applications of  $\beta$ -galactosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1 in the food field.

**Key words:** *Microbulbifer*;  $\beta$ -galactosidase; enzymatic properties; molecular docking

引文格式:

唐桂均,李鹤宾,朱艳冰,等.微泡菌 ALW1 重组  $\beta$ -半乳糖苷酶的异源表达和酶学性质[J].现代食品科技,2022,38(9):111-118

TANG Guijun, LI Hebin, ZHU Yanbing, et al. Heterologous Expression and Enzymatic Properties of Recombinant  $\beta$ -Galactosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1 [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 111-118

收稿日期: 2021-09-15

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2020J01679); 国家自然科学基金项目 (22178142)

作者简介: 唐桂均 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物, E-mail: tgj8325@163.com

通讯作者: 陈艳红 (1981-), 女, 实验师, 研究方向: 食品微生物, E-mail: yanhongchen@jmu.edu.cn

$\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase, EC 3.2.1.23) 又称乳糖酶 (Lactase), 是一种重要的生物催化剂<sup>[1]</sup>, 属于不同糖苷水解酶 (Glycoside Hydrolases, GH) 家族: GH1、GH2、GH35、GH42 和 GH59<sup>[2]</sup>。 $\beta$ -半乳糖苷酶不仅可以通过水解乳糖中的  $\beta$ -1,4-D-半乳吡喃糖苷键以达到降解乳糖的作用, 还可以通过转糖苷生成具有益生作用的低聚半乳糖 (GOS)<sup>[3,4]</sup>。

乳糖是乳品中重要的碳水化合物, 它是以单体分子形式存在于乳品中的双糖。人体无法直接吸收双糖分子, 双糖摄入后, 需分解成单糖才可被吸收利用。 $\beta$ -半乳糖苷酶可降解乳制品中的乳糖为半乳糖和葡萄糖, 有利于人体的吸收, 同时避免乳制品 (如冰淇淋和某些类型的奶酪) 在冷藏条件下形成乳糖结晶<sup>[5,6]</sup>, 保证乳制品质量。在工业生产中常利用  $\beta$ -半乳糖苷酶水解乳糖, 具有反应产物单一、不污染奶源, 以及不破坏其他成分等优点, 因此该酶在食品行业具有重要的应用价值。此外,  $\beta$ -半乳糖苷酶还可以与葡萄糖氧化酶联合使用制备生物传感器, 用于测定牛奶等乳制品中乳糖的含量<sup>[7]</sup>, 也可以用于乳清中乳糖的水解, 从而减缓乳清排放后对水造成的污染<sup>[8]</sup>。

$\beta$ -半乳糖苷酶在植物、微生物及动物体中较为常见, 大部分  $\beta$ -半乳糖苷酶来源于微生物<sup>[8,9]</sup>。来源于微生物的  $\beta$ -半乳糖苷酶具有高产、低成本、酶源广等优点。在工业应用中,  $\beta$ -半乳糖苷酶存在着稳定性差、酶活力不高等问题。因此, 研究不同微生物来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶, 筛选具有优良特性的酶具有重要意义<sup>[10]</sup>。不同来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶具有不同的酶学特性, 包括最适反应温度、最适反应 pH、温度稳定性、pH 稳定性等, 这也决定了酶的不同用途。例如, 黑曲霉来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶在酸性条件下具有好的稳定性和酶活力, 可用于治疗乳糖不耐症<sup>[11]</sup>; 丝状真菌来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶在碱性条件下酶活力良好, 常用于面包发酵<sup>[12]</sup>。

在先前的研究中, 从腐烂海带中分离出海洋微泡菌 ALW1<sup>[13]</sup>, 并进行了该菌株的基因组测序, 发现一个预测编码  $\beta$ -半乳糖苷酶的基因 (GenBank 收录号: Mw366919)。本研究对来自微泡菌的  $\beta$ -半乳糖苷酶进行克隆、表达和纯化, 并对其酶学性质进行研究, 为微泡菌 ALW1 的  $\beta$ -半乳糖苷酶的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 ( $p$ NP-Gal)、4-硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 ( $p$ NP-Glu)、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 ( $p$ NPG)、4-硝基苯基- $\alpha$ -L-吡喃岩

藻糖苷 ( $p$ NP- $\alpha$ -L-F)、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃岩藻糖苷 ( $p$ NP- $\beta$ -D-F)、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷 ( $p$ NPM) 和 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷 ( $p$ NP-xyl), Sigma-Aldrich 公司; Ni-NTA agarose, GE Healthcare Life Sciences 公司。

### 1.2 主要仪器与设备

Epoch2T 酶标仪, 美国博腾仪器有限公司; Avanti™J-25 冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; Unic3-18K 冷冻离心机, Sigma-Aldrich 公司; 超声破碎仪, 上海虔钧科学仪器有限公司; JS-680C 凝胶成像系统, 上海昕瑞有限公司。

### 1.3 $\beta$ -半乳糖苷酶的序列分析

利用 DNAMAN 软件对  $\beta$ -半乳糖苷酶的基因序列进行分析, 使用 ExPASy 中的 ProtParam 分析  $\beta$ -半乳糖苷酶的理论分子量和 pI, 使用 SignalP 5.0 分析  $\beta$ -半乳糖苷酶的信号肽。利用 BLAST 对 GenBank 数据库进行同源性搜索, 使用 ClustalX2 程序生成蛋白质序列的比对。在碳水化合物活性酶 (Carbohydrate-Active Enzyme, CAZy) 数据库中搜索、下载来自不同家族的典型  $\beta$ -半乳糖苷酶的基因序列, 利用 ClustalX2 和 MEGA7.0 软件构建  $\beta$ -半乳糖苷酶的系统发育树。

### 1.4 $\beta$ -半乳糖苷酶的基因工程表达菌株构建

以微泡菌 ALW1 的基因组 DNA 为模板, 使用 PCR 技术对  $\beta$ -半乳糖苷酶基因进行扩增。利用 DNA 回收试剂盒进行纯化后, 使用 *EcoRI* 和 *SaI* 分别对目的基因和表达载体 pET-28a(+) 进行双酶切反应。目的基因和表达载体使用 DNA 回收试剂盒纯化后进行连接反应, 将连接产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  中。转化后的细胞均匀涂布于含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h。经菌落 PCR 验证后, 对插入的序列进行测序分析, 将测序成功的重组质粒转化至 *E. coli* BL21 中, 获得含有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因重组表达质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 基因工程菌株。

### 1.5 $\beta$ -半乳糖苷酶的表达和纯化

将含微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的 *E. coli* BL21 (DE3) 按 1% (V/V) 的接种量接种到 250 mL LB 培养基 (含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素) 中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.8 时, 加入 25  $\mu$ L IPTG (0.5 mol/L), 在 18  $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下诱导表达 20 h。将发酵液在 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 条件下离心 10 min, 收集菌体沉

淀,用 10 mL 缓冲液(50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、300 mmol/L  $\text{NaCl}$ 、15 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 重悬菌体,冰浴条件下对菌体进行超声破碎,然后在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 20 min,收集上清液,即为粗酶液。参照 GE Healthcare Life Sciences 公司的 Ni-NTA 使用说明书纯化重组蛋白。利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析目的蛋白的纯度及其分子量大小。蛋白质浓度的测定参照 Bradford 法<sup>[14]</sup>,使用凝胶过滤层析法确定  $\beta$ -半乳糖苷酶的天然分子量<sup>[15]</sup>。

## 1.6 $\beta$ -半乳糖苷酶的活力测定

以 *pNP*-Gal 为底物测定  $\beta$ -半乳糖苷酶的活力。配制 2.5 mmol/L *pNP*-Gal 底物溶液(溶于 50 mmol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液, pH 值 4.5)。90  $\mu\text{L}$  底物溶液中加入 10  $\mu\text{L}$  酶液(0.1 mg/mL),在 30 °C 反应 10 min 后,立即加入 200  $\mu\text{L}$  1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应,在 405 nm 处测定吸光度值。每组做三个平行,以灭活的酶液作为空白组。 $\beta$ -半乳糖苷酶的酶活力单位定义为:在上述条件下,每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  *pNP* 所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

## 1.7 重组 $\beta$ -半乳糖苷酶的酶学性质研究

### 1.7.1 酶的底物特异性

用 50 mmol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液(pH 值 4.5) 配制 2.5 mmol/L 的不同人工底物溶液,包括 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷、4-硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -L-吡喃岩藻糖苷、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃岩藻糖苷、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷和 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷,按 1.6 的方法测定酶对不同底物的活力,研究酶的底物特异性。

### 1.7.2 温度对酶活力和稳定性的影响

将  $\beta$ -半乳糖苷酶在不同温度下(15、20、25、30、35、40 和 45 °C) 反应 10 min,测定酶的活力,研究酶的最适反应温度。为探究  $\beta$ -半乳糖苷酶的温度稳定性,将酶置于不同温度(4、15、20、25、30 和 35 °C) 下放置 2 h,每隔 30 min 取样,测定酶的残余活力。以未经处理的酶活力定为 100%。

### 1.7.3 pH 对酶活力和稳定性的影响

用 50 mmol/L 不同 pH 值的缓冲液分别配制 2.5 mmol/L 的 *pNP*-Gal 底物溶液,在不同 pH 条件下测定酶的活力,研究酶的最适反应 pH。为探究  $\beta$ -半乳糖苷酶的 pH 稳定性,将酶分别置于不同 pH 值的缓冲液中,在 25 °C 下放置 60 min 后,测定酶的残余活力。以未经处理的酶活力定为 100%。

## 1.7.4 酶的动力学参数的测定

用 50 mmol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液(pH 值 4.5) 配制不同浓度(2.5、5、10、15、20、25 mmol/L) 的 *pNP*-Gal 底物溶液。将  $\beta$ -半乳糖苷酶分别与不同浓度的底物反应,测定酶的活力。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,计算重组  $\beta$ -半乳糖苷酶的最大反应速率( $V_{\max}$ )与底物亲和常数( $K_m$ )。

## 1.8 化学添加剂对酶稳定性的影响

将  $\beta$ -半乳糖苷酶分别与不同金属离子( $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$ ) 或其他化学试剂(Triton X-100、吐温 20、吐温 80、SDS、CTAB、 $\beta$ -ME、DTT、EDTA、尿素)混合,使化学添加剂达到不同的指定终浓度。酶与化学试剂 25 °C 温育 30 min 后,加入 *pNP*-Gal 底物,测定酶的残余活力。以未添加化学试剂处理的酶活力定为 100%。

## 1.9 $\beta$ -半乳糖苷酶的三维建模及酶与 *pNP*-Gal

底物的分子对接

在 PDB 蛋白数据库获取模板,利用 Modeller 9.18 构建  $\beta$ -半乳糖苷酶的三维结构,*pNP*-Gal 的三维结构在 NCBI 中的 PubChem 下载 pdb 文件。应用 AutoDock 进行酶与底物的分子对接,选择构象最佳的对接结果,使用 Discovery Studio 2019 软件进行分析和图像显示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\beta$ -半乳糖苷酶的序列分析

微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的长度为 141 9 bp,编码 472 个氨基酸的蛋白质。该蛋白质的理论分子量和 pI 分别为 52.8 ku 和 5.29,该  $\beta$ -半乳糖苷酶不含有信号肽。蛋白序列的同源性分析表明,微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶与来源于 *Actinoalloteichus hymeniacidonis*(AOS64332.1)、*Amycolatopsis albispora*(AXB42219.1)、*AActinoplanes* sp. N902-109(AGL19093.1)和 *Amycolatopsis albispora*(AXB41531.1)的  $\beta$ -半乳糖苷酶分别具有 51%、50%、49%和 48%的相似性。蛋白质序列比对分析显示, $\beta$ -半乳糖苷酶含有 GH1 家族的  $\beta$ -半乳糖苷酶典型的氨基酸序列 NEP(185-187 位氨基酸)和 ENG(370-372 位氨基酸),其中 Glu186 预测为酸碱催化残基,Glu370 预测为亲核催化残基;差异序列主要集中于蛋白质中间区域及 C 末端(图 1)。采用系统进化分析来确定微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶所属家族。利用碳水化合物活性酶家族(CAZy)数据库中 5 个糖苷水解酶(GH)家

族的 16 个特征性  $\beta$ -半乳糖苷酶构建了系统发育树 (图 2)。该酶与来自 *Acidilobus* sp. 7 (AMD30575.1) 和 *Acidilobus saccharovorans* 345-15 (ADL19795.1) 的

$\beta$ -半乳糖苷酶在同一分支, 它们是 GH1 家族的代表成员。这些结果表明, 本研究中微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶属于 GH1 家族。

Table with multiple columns showing amino acid sequence alignments for various beta-galactosidase proteins (AGL19093.1, AXB41531.1, AOS64332.1, etc.) and a Target sequence. Conserved residues are highlighted in yellow.

图 1 微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶与其他  $\beta$ -半乳糖苷酶蛋白序列的比对分析

Fig.1 Alignment of  $\beta$ -galactosidase from *Microbulbifer* sp. with other  $\beta$ -galactosidase protein sequences

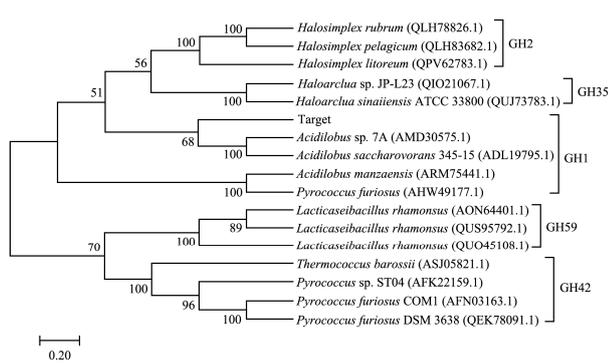


图 2  $\beta$ -半乳糖苷酶的系统发育分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of  $\beta$ -galactosidase

2.2  $\beta$ -半乳糖苷酶的表达和纯化

pET-28a(+)表达质粒插入外源基因后, 可表达出带有多聚组氨酸标签的重组蛋白。含有微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的 *E. coli* BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导表达和纯化后, SDS-PAGE 分析显示, 与经 IPTG 诱导表达的含 pET-28a(+)阴性菌(图 3,泳道 1)相比, 经 IPTG 诱导表达的含重组质粒的阳性菌在蛋白理论分子量

小的位置附近有明显的蛋白表达条带(图 3,泳道 2), 说明有目的蛋白表达。 $\beta$ -半乳糖苷酶大量诱导表达后, 利用超声进行菌体破碎, 上清过 Ni-NTA Agarose 亲和层析柱, 获得重组  $\beta$ -半乳糖苷酶, 重组酶的分子质量约为 64 ku (图 3,泳道 3)。使用 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析法测定纯化的重组酶分子量为 64.6 ku。这些结果表明, 微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶是单亚基蛋白质。

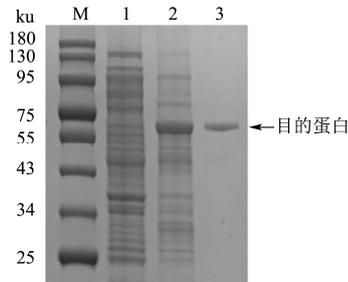


图 3  $\beta$ -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达

Fig.3 Expression of  $\beta$ -galactosidase gene in *E. coli*

注: M: 分子量标准蛋白; 1: IPTG 诱导的含 pET-28a(+)空载阴性菌; 2: IPTG 诱导的含重组质粒阳性菌; 3: 经 Ni-NTA agarose 纯化后的重组蛋白。

### 2.3 微泡菌 $\beta$ -半乳糖苷酶的酶学性质

#### 2.3.1 $\beta$ -半乳糖苷酶的底物特异性

根据酶与不同底物反应生成 *p*NP 的含量不同来研究  $\beta$ -半乳糖苷酶的底物特异性。如表 1 所示, 相比于 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷, 微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶对 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -L-吡喃岩藻糖苷的相对酶活力分别为 153.79% 和 158.16%, 对 4-硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -L-吡喃岩藻糖苷、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷无活力。结果表明, 微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶对具有立体化学偏好的芳基- $\beta$ -糖苷具有特异性作用。

表 1  $\beta$ -半乳糖苷酶的底物特异性

Table 1 Substrate specificity of  $\beta$ -galactosidase

底物	相对酶活力/%
4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷	100.00±5.34
4-硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷	0.27±0.15
4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷	153.79±0.61
4-硝基苯基- $\alpha$ -L-吡喃岩藻糖苷	0.17±0.12
4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃岩藻糖苷	158.16±0.78
4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷	0.99±0.07
4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷	2.22±0.20

#### 2.3.2 温度对 $\beta$ -半乳糖苷酶活力和稳定性的影响

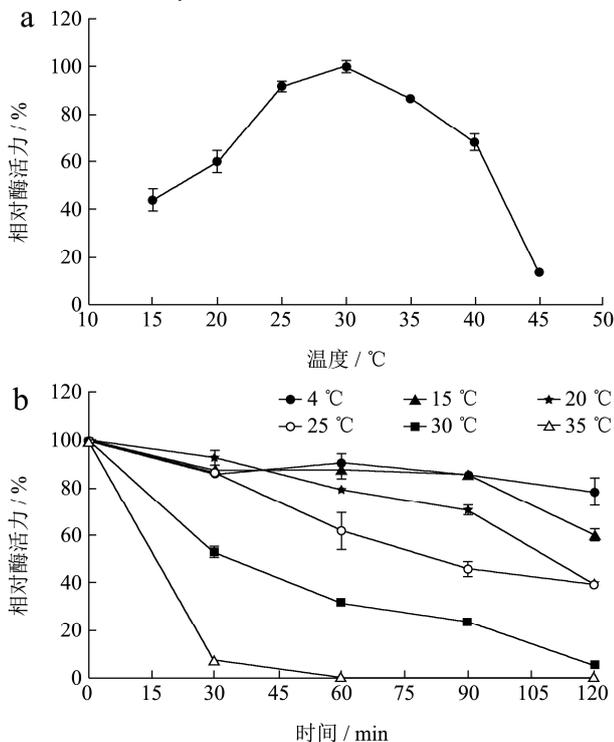


图 4 温度对  $\beta$ -半乳糖苷酶活力和稳定性的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity and stability of  $\beta$ -galactosidase

温度对微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶活力的影响结果 (图 4a) 显示,  $\beta$ -半乳糖苷酶的最适温度为 30 °C, 在 20~40 °C 之间相对活性保持在 60% 以上, 在 45 °C 时, 相对活性急剧下降至 13.75%。温度对  $\beta$ -半乳糖苷酶稳定性的影响结果 (图 4b) 显示, 随着时间变化, 酶的稳定性呈下降趋势。温度  $\leq 25$  °C 时, 酶活力下降较慢, 在 4 °C 和 25 °C 放置 2 h 后, 酶分别具有 78.26% 和 38.35% 的相对酶活力。温度为 30 °C 和 35 °C 时, 酶活力下降显著, 在 30 °C 和 35 °C 放置 30 min 后, 相对酶活力迅速分别降至 53.05% 和 7.58%。目前商业  $\beta$ -半乳糖苷酶大多为中温酶, 而乳品加工中许多工艺以及贮运均在低温下进行<sup>[16]</sup>。朱五二等<sup>[17]</sup>研究的盐单胞菌 S62 来源低温  $\beta$ -半乳糖苷酶生成低聚半乳糖的最适反应温度为 40 °C。Turkiewicz 等<sup>[18]</sup>的研究中, *Pseudoalteromonas* sp. 22b 来源的低温  $\beta$ -半乳糖苷酶最适反应温度为 40 °C。与上述报道的低温  $\beta$ -半乳糖苷酶相比, 本研究中微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的最适反应温度相对较低, 且在低温条件下仍能保留较高的酶活力, 因此本研究的  $\beta$ -半乳糖苷酶在乳品加工中具有应用潜力。

#### 2.3.3 pH 对 $\beta$ -半乳糖苷酶活力和稳定性的影响

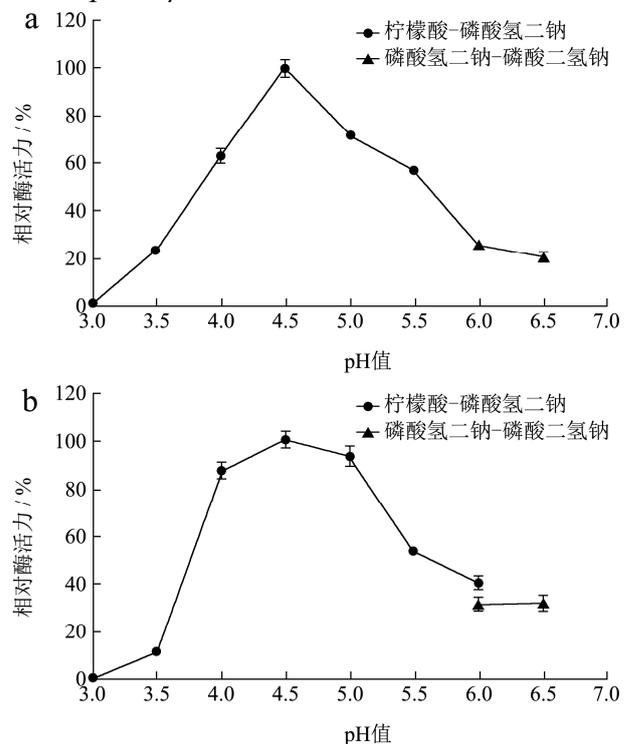


图 5 pH 对  $\beta$ -半乳糖苷酶活力和稳定性的影响

Fig.5 Effect of pH on the activity and stability of  $\beta$ -galactosidase

pH 对微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶活力的影响如图 5a 所示。  $\beta$ -半乳糖苷酶的最适 pH 为 4.5, pH 值在 4.0~5.5 时, 相对酶活力在 55% 以上。为探究  $\beta$ -半乳糖苷酶的 pH 稳定性, 在不同 pH 条件下对酶处理 1 h。结果表明 (图 5b),  $\beta$ -半乳糖苷酶在 pH 值 4.0~5.0 范围内具

有良好的稳定性, 残余酶活力在 80%以上。在以往报道中, *Erwinia* sp. E602 来源  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[19]</sup>的最适反应 pH 值为 7.0, 在 pH 4.0 下处理 1 h 后的残余酶活力为 55%; *Paracoccus marcusii* KGP 来源  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[20]</sup>的最适反应 pH 为 8.0, 在 pH 4.0 下处理 30 min 后无酶活力。而本研究中微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的最适 pH 相对较低, 且在酸性条件下具有优良的稳定性。

### 2.3.4 $\beta$ -半乳糖苷酶的动力学参数

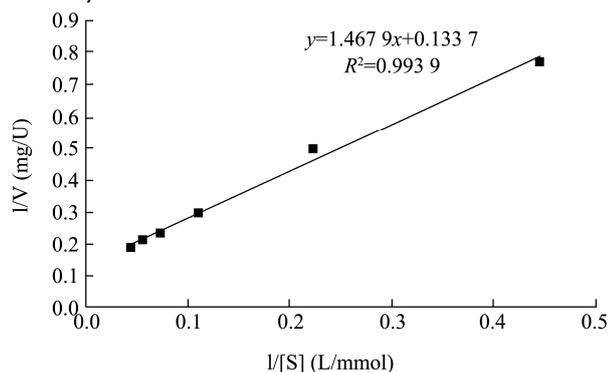


图 6  $\beta$ -半乳糖苷酶作用于 pNP-Gal 的双倒数曲线

Fig.6 The lineweaver-burk of  $\beta$ -galactosidase acting on pNP-Gal

表 2 不同来源  $\beta$ -半乳糖苷酶的酶学性质

Table 2 Enzymatic properties of  $\beta$ -galactosidases from different sources

来源	最适温度/°C	最适 pH 值	温度稳定性	pH 稳定性	动力学参数
<i>Microbulbifer</i> sp. ALW1 (本研究)	30	4.5	30 °C 处理 30 min, 53%残余酶活力	pH 4.0~5.0 下处理 1 h, 超过 80%的残余酶活力	$K_m=10.98$ mmol/L; $V_{max}=7.48$ U/mg
<i>Erwinia</i> sp. E602 <sup>[19]</sup>	40	7.0	40 °C 半衰期为 7 h	pH 4.0 和 9.0 下处理 1 h, 分别保留 55%和 85%残余酶活力	$K_m=0.21$ mmol/L; $V_{max}=263.16$ $\mu$ mol/mg/min
<i>Paracoccus marcusii</i> KGP <sup>[20]</sup>	86	8.0	ND	在 pH 4.0 下处理 15 min, 无酶活力	$K_m=1.00$ mmol/L; $V_{max}=8.56$ $\mu$ mol/mg/min
<i>Lactobacillus plantarum</i> FMNP01 <sup>[22]</sup>	40	7.0	40 °C 处理 1 h, 95%残余酶活力	ND	$K_m=6.68$ mmol/L; $V_{max}=2.24$ $\mu$ mol/mg/min
<i>Lactobacillus curieae</i> M2011381 <sup>[23]</sup>	55	8.0	45 °C 处理 2 h, 58%残余酶活力	pH 5.0 下处理 1 h, 20%残余酶活力	$K_m=0.94$ mmol/L; $V_{max}=404$ $\mu$ mol/mg/min
<i>Akkermansia muciniphila</i> <sup>[21]</sup>	60	6.0	ND	ND	$K_m=1.80$ mmol/L; $V_{max}=3.3$ U/mg

### 2.4 化学添加剂对 $\beta$ -半乳糖苷酶稳定性的影响

金属离子能通过调节催化过程或酶的结构对酶活力产生影响<sup>[24]</sup>。将微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶利用不同金属离子处理后, 测定酶的剩余活力。由图 7 可得, 测试的金属离子(包括  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 和  $Fe^{3+}$ )对  $\beta$ -半乳糖苷酶活力存在不同程度的抑制作用。其中, 10 mmol/L 的  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  处理后,  $\beta$ -半乳糖苷酶保留 80%的相对酶活力;  $Zn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  处理后,  $\beta$ -半乳糖苷酶几乎丧失其酶活力, 这

以 pNP-Gal 为底物, 研究微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的动力学参数。当  $\beta$ -半乳糖苷酶与不同浓度的 pNP-Gal 进行反应后, 通过计算反应初速度绘制出双倒数曲线(图 6), 计算出微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 10.98 mmol/L 和 7.48 U/mg, 高于来自 *Akkermansia muciniphila*<sup>[21]</sup>的  $\beta$ -半乳糖苷酶的  $K_m$  和  $V_{max}$ 。

### 2.3.5 不同来源 $\beta$ -半乳糖苷酶的酶学性质比较

不同来源  $\beta$ -半乳糖苷酶的酶学性质见表 2, 可以看出, 相较于其他来源的酶, 本研究中微泡菌来源  $\beta$ -半乳糖苷酶的最适反应温度较低, 而且酶的温度稳定性不高; 该酶在酸性条件下起作用, 并在 pH 值 4.0~5.0 的条件下具有优良的耐酸性, 使其更适用于酸性乳清和干酪的水解。动力学参数比较分析显示, 微泡菌来源  $\beta$ -半乳糖苷酶具有较高的  $K_m$  值, 该酶的  $V_{max}$  值高于 *Lactobacillus plantarum* FMNP01 和 *Akkermansia muciniphila* 来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶, 低于 *Erwinia* sp. E602、*Paracoccus marcusii* KGP 和 *Lactobacillus curieae* M2011381 来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶。

与来自 *Alteromonas* sp. ML117 和 *Akkermansia muciniphila* 的  $\beta$ -半乳糖苷酶的研究结果相似<sup>[21,25]</sup>。

其他化学添加剂对微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶稳定性的影响结果如表 3 所示。 $\beta$ -半乳糖苷酶对非离子型去垢剂吐温 80 和低浓度的吐温 20 具有良好的稳定性, 当吐温 20 浓度为 1%时, 酶活力提高到 157.09%; 非离子型去垢剂 Triton X-100 对酶活力具有抑制作用。离子型去垢剂 SDS 和 CTAB 存在时,  $\beta$ -半乳糖苷酶几乎丧失活性。还原试剂 DTT 对  $\beta$ -半乳糖苷酶活力具有促进作用; 低浓度的  $\beta$ -ME 还原试剂对酶活力没有影

响,但高浓度下呈现中等抑制作用。金属螯合剂 EDTA 对  $\beta$ -半乳糖苷酶表现出中等抑制作用,表明它可能是一种对二价阳离子有一定要求的金属酶,而对于来自 *Bacillus subtilis* 的  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[26]</sup>, EDTA 则不会影响其活力。变性剂尿素强烈抑制  $\beta$ -半乳糖苷酶的活力, 2.5 mol/L 尿素处理后,酶的活力完全丧失。

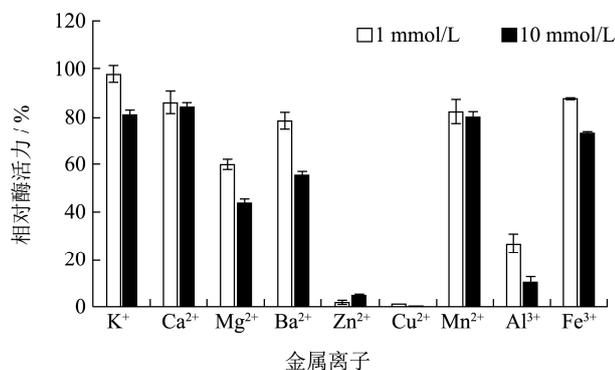


图7 金属离子对  $\beta$ -半乳糖苷酶稳定性的影响

Fig.7 Effects of metal ions on the stability of  $\beta$ -galactosidase

表3 其他化学添加剂对  $\beta$ -半乳糖苷酶稳定性的影响

Table 3 Effects of other chemical reagents on the stability of  $\beta$ -galactosidase

$\beta$ -galactosidase		
化学添加剂	浓度	相对酶活力/%
对照	-	100.00±3.40
Triton X-100	0.1%	30.90±3.00
	1%	21.80±5.80
吐温 20	0.1%	131.74±3.90
	1%	157.09±2.60
吐温 80	0.1%	112.90±8.50
	1%	100.80±5.20
SDS	0.1%	0.37±0.20
	1%	0.46±0.30
CTAB	0.1%	0.11±0.17
	1%	0.23±0.30
$\beta$ -ME	1 mmol/L	97.00±6.10
	10 mmol/L	74.00±5.90
DTT	1 mmol/L	122.50±8.80
	10 mmol/L	127.00±7.70
EDTA	1 mmol/L	85.80±1.30
	10 mmol/L	70.80±1.80
尿素	1 mol/L	38.30±3.50
	2.5 mol/L	0.20±0.20

### 2.5 $\beta$ -半乳糖苷酶的三维结构及酶与底物的相互作用

将微泡菌 ALW1 的  $\beta$ -半乳糖苷酶进行三维建模,

在 PDB 数据库中进行同源搜索,模板的 PDB 登入号为 1UYQ,氨基酸残基的范围为 24-471,与模板序列相似度为 42.9%。微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的三维结构中观察到糖苷水解酶 GH1 家族典型的  $(\alpha/\beta)_8$  桶结构域,其中催化残基 Glu186 和 Glu370 被标记(图 8a)。

为进一步从分子水平上认知  $\beta$ -半乳糖苷酶与底物相互作用模式,利用分子对接研究了 *p*NP-Gal 在活性位点处的作用模式。*p*NP-Gal 与  $\beta$ -半乳糖苷酶的分子对接结果如图 8b 所示,酸碱催化残基 Glu186 和亲核催化残基 Glu370 在糖环两侧, Tyr314、Thr315、Glu370 和 Glu431 与 *p*NP-Gal 形成氢键(图 8b,绿色线条), Tyr314 还与底物形成 Pi-Pi T 型作用力(图 8b,紫色线条)。

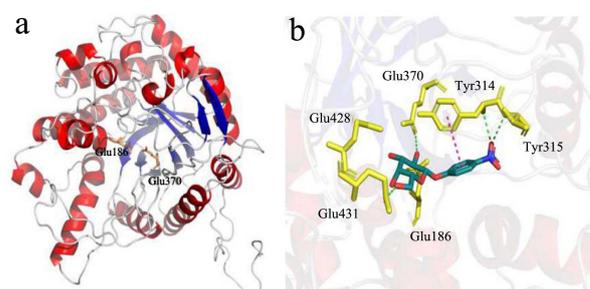


图8 微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的三维结构(a)及酶与底物的分子对接(b)

Fig.8 The tertiary structure of  $\beta$ -galactosidase from *Microbulbifer* sp. (a) and molecular docking of  $\beta$ -galactosidase and *p*NP-Gal substrate (b)

### 3 结论

本研究将来自微泡菌 ALW1 菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶进行表达和纯化,研究其酶学性质。微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶归属于 GH1 家族,在温度低于 25 °C 时具有良好的温度稳定性,在酸性条件(pH 值 4.0~5.5)下表现出较好的稳定性。 $\beta$ -半乳糖苷酶对还原试剂 DTT、一些非离子型去垢剂(吐温 80 和吐温 20)显示良好的稳定性。分子对接提供了微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶与 *p*NP-Gal 底物相互作用模式的深入了解,对微泡菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的应用奠定理论基础。

### 参考文献

[1] 刘芳宁,梁琪,张炎,等.微生物  $\beta$ -半乳糖苷酶的研究进展[J].中国酿造,2012,31(12):5-9  
LIU Fangning, LIANG Qi, ZHANG Yan, et al. Research advancement on  $\beta$ -galactosidase from microorganism [J]. China Brewing, 2012, 31(12): 5-9

[2] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: D233-D238

- [3] 姜陈波,杭锋.双歧杆菌和乳酸菌 $\beta$ -半乳糖苷酶转糖基作用的研究进展[J].食品科学,2019,40(7):335-341  
JIANG Chenbo, HANG Feng. Advances in our understanding of the transgalactosylation activity of  $\beta$ -Galactosidase from *Bifidobacteria* and lactic acid bacteria [J]. Food Science, 2019, 40(7): 335-341
- [4] Nivetha A, Mohanasrinivasan V. Mini review on role of  $\beta$ -galactosidase in lactose intolerance [J]. Materials Science and Engineering, 2017, 263(2): 1-6
- [5] Harju M. Milk sugars and minerals as ingredients [J]. International Journal of Dairy Technology, 2001, 54(2): 61-63
- [6] Harju M, Kallioinen H, Tossavainen O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: technological aspects [J]. International Dairy Journal, 2012, 22(2): 104-109
- [7] Goktug T, Sezginurk M K, Dinckaya E. Glucose oxidase- $\beta$ -galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 551(1-2): 51-56
- [8] Bansal S, Oberoi H S, Dhillon G S, et al. Production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on  $\beta$ -galactosidase activity [J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(3): 337-341
- [9] Lu L L, Guo L C, Wang K, et al.  $\beta$ -Galactosidases: a great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates [J]. Biotechnology Advances, 2020, 39: 107465
- [10] Liu P, Wang W, Zhao J, et al. Screening novel  $\beta$ -galactosidases from a sequence-based metagenome and characterization of an alkaline  $\beta$ -galactosidase for the enzymatic synthesis of galactooligosaccharides [J]. Protein Expression and Purification, 2019, 155: 104-111
- [11] O'connell S, Walsh G. A novel acid-stable, acid-active  $\beta$ -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(2): 517-524
- [12] Xavier J R, Ramana K V, Sharma R K.  $\beta$ -galactosidase: Biotechnological applications in food processing [J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(5): e12564
- [13] Zhu Y B, Wu L Y, Chen Y H, et al. Characterization of an extracellular biofunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates [J]. Microbiological Research, 2016, 182: 49-58
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [15] Zhu Y B, Zhao R, Xiao A F, et al. Characterization of an alkaline  $\beta$ -agarase from *Stenotrophomonas* sp. NTA and the enzymatic hydrolysates [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 86: 525-534
- [16] 王辉,张秀玲.低乳糖牛奶生产工艺参数的研究[J].中国乳品工业,2006,34(1):52-53  
WANG Hui, ZHANG Xiuling. Study on the manufacture parameter of low-lactose milk [J]. China Dairy Industry, 2006, 34(1): 52-53
- [17] 朱五二,缪明永,顾正华,等.盐单胞菌 S62  $\beta$ -半乳糖苷酶合成低聚半乳糖的研究[J].生物加工过程,2019,17(2):131-137  
ZHU Wuer, MIU Mingyong, GU Zhenghua, et al. Synthesis of galactooligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Halomonas* sp. S62 [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(2): 131-137
- [18] Turkiewicz M, Kur J, Bialkowska A, et al. Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b as a source of cold-adapted  $\beta$ -galactosidase [J]. Biomolecular Engineering, 2003, 20(4-6): 317-324
- [19] Xia Y, He L L, Mao J J, et al. Purification, characterization, and gene cloning of a new cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from *Erwinia* sp. E602 isolated in northeast China [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(8): 6946-6954
- [20] Kalathinathan P, Pulicherla K, Sain A, et al. New alkali tolerant  $\beta$ -galactosidase from *Paracoccus marcusii* KGP - A promising biocatalyst for the synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (OsLu), the new generation prebiotics [J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 115: 105207
- [21] Kosciow K, Deppenmeier U. Characterization of three novel  $\beta$ -galactosidases from *Akkermansia muciniphila* involved in mucin degradation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 331-340
- [22] Liao X Y, Zheng Q W, Zhou Q L, et al. Characterization of recombinant  $\beta$ -galactosidase and its use in enzymatic synthesis of lactulose from lactose and fructose [J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2016, 134: 253-260
- [23] Zhu J Y, Sun J Q, Tang Y J, et al. Expression, characterization and structural profile of a heterodimeric  $\beta$ -galactosidase from the novel strain *Lactobacillus curieae* M2011381 [J]. Process Biochemistry, 2020, 97: 87-95
- [24] Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, et al. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles [J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2008, 13(8): 1205-1218
- [25] Yao C Y, Sun J J, Wang W, et al. A novel cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from *Alteromonas* sp. ML117 cleaves milk lactose effectively at low temperature [J]. Process Biochemistry, 2019, 82: 94-101
- [26] Carneiro L, Yu L, Dupree P, et al. Characterization of a  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus subtilis* with transgalactosylation activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 279-287