

doi:10.12301/spxb202300002

文章编号:2095-6002(2023)06-0029-10

引用格式:王建宇,李婷,李敬,等.芽孢杆菌35家族 β -半乳糖苷酶的性质及其在合成低聚半乳糖中的应用[J].食品科学技术学报,2023,41(6):29-38.



WANG Jianyu, LI Ting, LI Jing, et al. Characterization of GH family 35 β -galactosidase from *Bacillales* sp. and its application in synthesis of galactooligosaccharides[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(6):29-38.

芽孢杆菌35家族 β -半乳糖苷酶的性质及其在合成低聚半乳糖中的应用

王建宇¹, 李婷¹, 李敬², 江正强², 闫巧娟^{1,*}

(1. 中国农业大学工学院/中国轻工业食品生物工程重点实验室, 北京 100083;

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:低聚半乳糖是一种重要的益生元,芽孢杆菌(*Bacillales* sp.)来源的 β -半乳糖苷酶具有转半乳糖苷活性,能合成低聚半乳糖。研究了一个新的芽孢杆菌来源的 β -半乳糖苷酶的表达、酶学性质及其在合成低聚半乳糖中的应用。从芽孢杆菌中克隆了一个糖苷水解酶35家族的 β -半乳糖苷酶基因(*BABgal35A*),并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。多重序列比对结果表明:*BABgal35A*与环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)来源的 β -半乳糖苷酶同源性最高,为79.9%,是一个新型的 β -半乳糖苷酶(命名为*BABgal35A*)。粗酶液经Ni-IDA亲和层析纯化得到电泳级纯酶,蛋白电泳分析表明其分子质量为60 kDa左右,最适pH值和温度分别为5.0和55℃,并且该酶在pH值为4.5~8.0,温度为20~45℃时稳定性好。*BABgal35A*对 α -NP- β -galactopyranoside具有较高的催化活性。该酶以乳糖为底物合成低聚半乳糖的产率达34%。研究结果表明,芽孢杆菌35家族 β -半乳糖苷酶在低聚半乳糖的制备中具有潜在的应用价值。

关键词:芽孢杆菌; β -半乳糖苷酶;功能性低聚糖;酶学性质;低聚半乳糖

中图分类号:TS245.9

文献标志码:A

低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)为乳糖的非还原端半乳糖上连接不同数量(2~8个)的半乳糖,是一种功能性低聚糖,常作为健康食品原料广泛应用于食品等行业,多年来备受关注^[1-2]。GOS除具有益生活性外,还有预防蛀牙和调节脂质代谢等功效^[1,3]。GOS的安全性已得到广泛认可,如美国已将其作为公认安全的食品原料,我国也批准其为营养增强剂和新食品原料。GOS与人乳中的人乳寡糖在结构与功能上具有一定的相似性,可被人体内的肠道微生物特异性利用,已批准用于婴

幼儿配方奶粉中^[4]。

酶法合成GOS是目前研究最多的GOS合成方法,也是工业化生产GOS的方法^[4]。 β -半乳糖苷酶(EC3.2.1.23)是一种糖苷水解酶,既可以催化糖类化合物中非还原端 β -半乳糖残基的水解,也能够以高浓度乳糖作为底物,通过转糖苷作用合成GOS。 β -半乳糖苷酶合成GOS的过程为, β -半乳糖苷酶首先水解乳糖,然后利用其转糖基活性将半乳糖转移至不同的糖基受体上,从而形成GOS^[1,5]。 β -半乳糖苷酶广泛存在于动物、植物以及微生物中。微生

收稿日期:2023-01-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32172159)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China (32172159).

第一作者:王建宇,男,博士研究生,研究方向为食品生物技术。

*通信作者:闫巧娟,女,教授,博士,主要从事食品生物技术方面的研究。

物具有来源广、繁殖速度快以及生长周期短等优点,是 β -半乳糖苷酶的主要来源^[6]。工业化生产 GOS 所用的 β -半乳糖苷酶多数来源于乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)以及环状芽孢杆菌等^[1],但是大多数仍存在 GOS 产率低的问题^[7]。因此,发掘酶学性质优良且转糖苷活性高的 β -半乳糖苷酶至关重要。

芽孢杆菌来源的 β -半乳糖苷酶性质优良,但是多数研究集中于 β -半乳糖苷酶的水解活性^[8-12]。另外,芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶也具有较好的 GOS 合成能力,如已有报道,芽孢杆菌^[13]和巴伦葛兹类芽孢杆菌(*Paenibacillus barengoltzii*)^[14] β -半乳糖苷酶均能够合成 GOS,产率分别为 36% 和 47.9%,其中,多数 GH35 家族 β -半乳糖苷酶合成 GOS 的产率较高,可达 40%^[15-17]。然而,迄今利用芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶合成 GOS 的报道仍旧较少,不足以满足工业化大量和高效生产 GOS 的需求。因此,从芽孢杆菌中发掘高效合成 GOS 的新型 β -半乳糖苷酶可以为工业化生产 GOS 提供更多的选择。

本研究拟从芽孢杆菌基因组中发掘新的糖苷水解酶 35 家族 β -半乳糖苷酶基因。将该基因在大肠杆菌中表达,研究重组酶的酶学性质,并利用该酶制备 GOS,以期 GOS 的酶法合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21 (DE3),北京博迈德生物技术公司;限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶,美国 NEB 公司;TransStart Fastpfu DNA 聚合酶和 ExTaq DNA 聚合酶,北京全式金生物技术有限公司;人工合成糖苷[*o*NP- β -galactopyranoside (β -*o*NPGal)、*p*NP- β -galactopyranoside (β -*p*NPGal)、*p*NP- β -fucopyranoside (*p*NP-Fuc)、*p*NP- β -glucopyranoside (β -*p*NPGlu)、*p*NP- β -mannopyranoside (β -*p*NPMan)、*p*NP- β -xylopyranoside (β -*p*NPXyl)、*p*NP- β -N-acetylglucosaminide (β -*p*NPGlcNAc)、*p*NP- α -galactopyranoside (α -*p*NPGal) 和 *p*NP- α -glucopyranoside (α -*p*NPGlu)],美国 Sigma 公司;标准品(乳糖、葡萄糖和半乳糖),上海源叶生物科技有限公司。其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

1.2 仪器与设备

MyCycler 型 PCR 自动扩增仪和 Power Pac

Basic™ 型电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;TU-1800PC 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;JY92-II 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝科技股份有限公司;ÄKTA 型蛋白纯化系统,美国 GE 公司;1260 Infinity 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 β -半乳糖苷酶基因的克隆与表达

芽孢杆菌来源的 β -半乳糖苷酶基因(*BABgal35A*)序列从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上获得,由上海擎科生物科技有限公司合成。根据序列信息设计 *BABgal35A* 上游引物(5'-GAATTCATGTTAACGTTTAATGAAAATCATTTTT-3')和下游引物(5'-GCGGCCGCTTATCCTAAACGGGCGTATCAA-3')。上下游引物分别包含 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点(下划线表示),以合成的 *BABgal35A* 基因为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 ℃,5 min;94 ℃,30 s;54 ℃,30 s;72 ℃,1 min;34 个循环;72 ℃,5 min。凝胶回收的 PCR 产物和 pET-28a(+) 载体(Invitrogen 公司)用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切,构建重组质粒并转入大肠杆菌 DH5 α 中,筛选阳性克隆转化子和提取重组质粒 pET-28a-*BABgal35A*。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)中,于 37 ℃ 培养 12 h。挑取单菌落接种至 15 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 培养 12 h 作为种子液。种子液按体积分数为 1% 的接种量接种至 300 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,培养菌体密度 *OD*₆₀₀ 达 0.6 ~ 0.8 后,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,在 20 ℃、200 r/min 条件下诱导培养 12 h。

1.3.2 β -半乳糖苷酶的纯化

发酵液经 10 000 r/min 离心 3 min,收集菌体细胞并用缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 值为 8.0) 悬浮细胞。悬浮液超声破壁后,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为粗酶液。粗酶液上样到预先用缓冲液 A 平衡的 Ni-IDA (1 cm $\times$ 10 cm) 上,在蛋白纯化系统上用缓冲液 A 和缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, pH 值为 8.0) 以 -1 mL/min 的流速对目标蛋白进行 20 ~ 200 mmol/L 梯度咪唑的线性洗脱。收集具有 β -半乳糖苷酶活性的洗脱液,在磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH 值为 8.0) 中透析过夜,采用

SDS-PAGE 法分析蛋白纯度。将该蛋白重组酶命名为 BABgal35A。

1.3.3 BABgal35A 酶活力和蛋白含量的测定

β -半乳糖苷酶的酶活力测定以 225 μ L 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 值为 5.0) 配制的 5 mmol/L β -oNPGal 为底物,加入 25 μ L 稀释的酶液,55 $^{\circ}$ C 反应 10 min。反应结束后,加入 750 μ L Na_2CO_3 (2 mol/L) 终止反应,测定 OD_{410} 值。酶活力单位定义:在 pH 值为 5.0 和温度为 55 $^{\circ}$ C 条件下,每分钟水解 β -oNPGal 产生 1 μ mol oNP 所需酶量,为 1 个酶活力单位(U)。

蛋白含量参照 Lowry 法测定^[18],以牛血清蛋白作为标准蛋白。

1.3.4 BABgal35A 的酶学性质的测定

1.3.4.1 最适 pH 值和酸碱稳定性的测定

利用不同 pH 值 (3.0 ~ 9.0) 的缓冲液 (50 mmol/L) 配制 5 mmol/L 的 β -oNPGal,所用缓冲液包括柠檬酸盐缓冲液 (pH 值为 3.0 ~ 6.0)、乙酸盐缓冲液 (pH 值为 4.0 ~ 6.0)、MES 缓冲液 (pH 值为 5.5 ~ 6.5)、磷酸盐缓冲液 (pH 值为 6.0 ~ 8.0) 和 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值为 7.0 ~ 9.0)。按照标准方法测定不同 pH 值下的酶活力。以最高酶活力为 100%,计算各 pH 值下的相对酶活。酸碱稳定性的测定:用不同 pH 值的缓冲液将酶液稀释,在 40 $^{\circ}$ C 保温 30 min,立即冰水浴 30 min,按照标准方法测定残余酶活,以未处理的酶液酶活力为 100%,分别计算各 pH 值下的相对酶活。

1.3.4.2 最适温度、热稳定性以及半衰期的测定

用 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 值为 5.0) 配制 5 mmol/L 的 β -oNPGal,测定不同温度 (20 ~ 75 $^{\circ}$ C) 下的酶活力。以最高酶活为 100%,分别计算各温度下的相对酶活。热稳定性的测定:用 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 值为 5.0) 稀释酶液并置于不同温度 (20 ~ 55 $^{\circ}$ C) 下保温 30 min,立即冰水浴 30 min,按照标准方法测定残余酶活;以未处理的酶液酶活力为 100%,分别计算不同温度下的相对酶活力。半衰期的测定:用 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 值为 5.0) 稀释酶液,分别在 40、45、50 $^{\circ}$ C 下保温,在不同时间点取样后立即冰水浴 30 min,在最适条件 (55 $^{\circ}$ C, pH 值为 5.0) 下测定残余酶活;以未处理酶液的酶活力为 100%,分别计算各温度处理后的相对酶活,酶活降低至 50% 所需的时间即为半衰期。

1.3.5 BABgal35A 的底物特异性与动力学参数的测定

1.3.5.1 底物特异性的测定

分别以人工合成糖苷 (β -oNPGal、 β -pNPGal、pNP-Fuc、 β -pNPGlu、 β -pNPMann、 β -pNPXyl、 β -pNPGlcNAc、 α -pNPGal 和 α -pNPGlu) 和乳糖为底物测定 BABgal35A 的底物特异性。人工合成糖苷的酶活按照标准方法测定。乳糖的测定参照葡萄糖氧化酶法,即用 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 值为 5.0) 配制质量浓度为 50 g/L 的乳糖并加入稀释的酶液,55 $^{\circ}$ C 反应 10 min,葡萄糖的含量利用葡萄糖氧化酶试剂盒测定。酶活力单位定义:每分钟水解人工合成糖苷或乳糖产生 1 μ mol oNP/pNP 或葡萄糖所需酶量为 1 个酶活力单位(U)。以 β -oNPGal 为底物时的酶活力为 100%,计算不同底物下酶活力的相对值。

1.3.5.2 动力学参数的测定

用 50 mmol/L pH 值 5.0 的乙酸盐缓冲液配制底物浓度为 0.4 ~ 4.0 mmol/L 的 β -oNPGal,按照标准方法于 55 $^{\circ}$ C 反应 5 min 后测定其酶活力,通过 GraFit 软件计算出米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 。

1.3.6 BABgal35A 合成低聚半乳糖条件的优化

在 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 值为 5.0) 体系下,以乳糖为底物,研究底物浓度、加酶量、反应温度和时间 4 个因素对 BABgal35A 合成 GOS 能力的影响。选择质量浓度为 300 ~ 500 g/L 的乳糖,加入 2 U/mL 的酶液,35 $^{\circ}$ C 反应 12 h 后,沸水浴 5 min。确定最适乳糖浓度后,其他条件不变,优化 BABgal35A 合成 GOS 的加酶量 (1 ~ 10 U/mL)。反应温度的优化是在最优乳糖浓度和最适加酶量的条件下进行的,在不同温度 (25 ~ 45 $^{\circ}$ C) 下反应 12 h。利用 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 值为 5.0) 配制质量浓度为 400 g/L 的乳糖溶液,加入 5 U/mL 的 BABgal35A,40 $^{\circ}$ C 反应 24 h,分别在不同时间点取样,根据式(1)计算 GOS 产率。采用高效液相色谱法分析样品,检测条件参照文献[14]。

$$\text{GOS 产率} = (M - m) / M \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, M ,初始乳糖质量浓度, g/L; m ,不同时间点样品的乳糖、葡萄糖以及半乳糖的质量浓度之和, g/L。

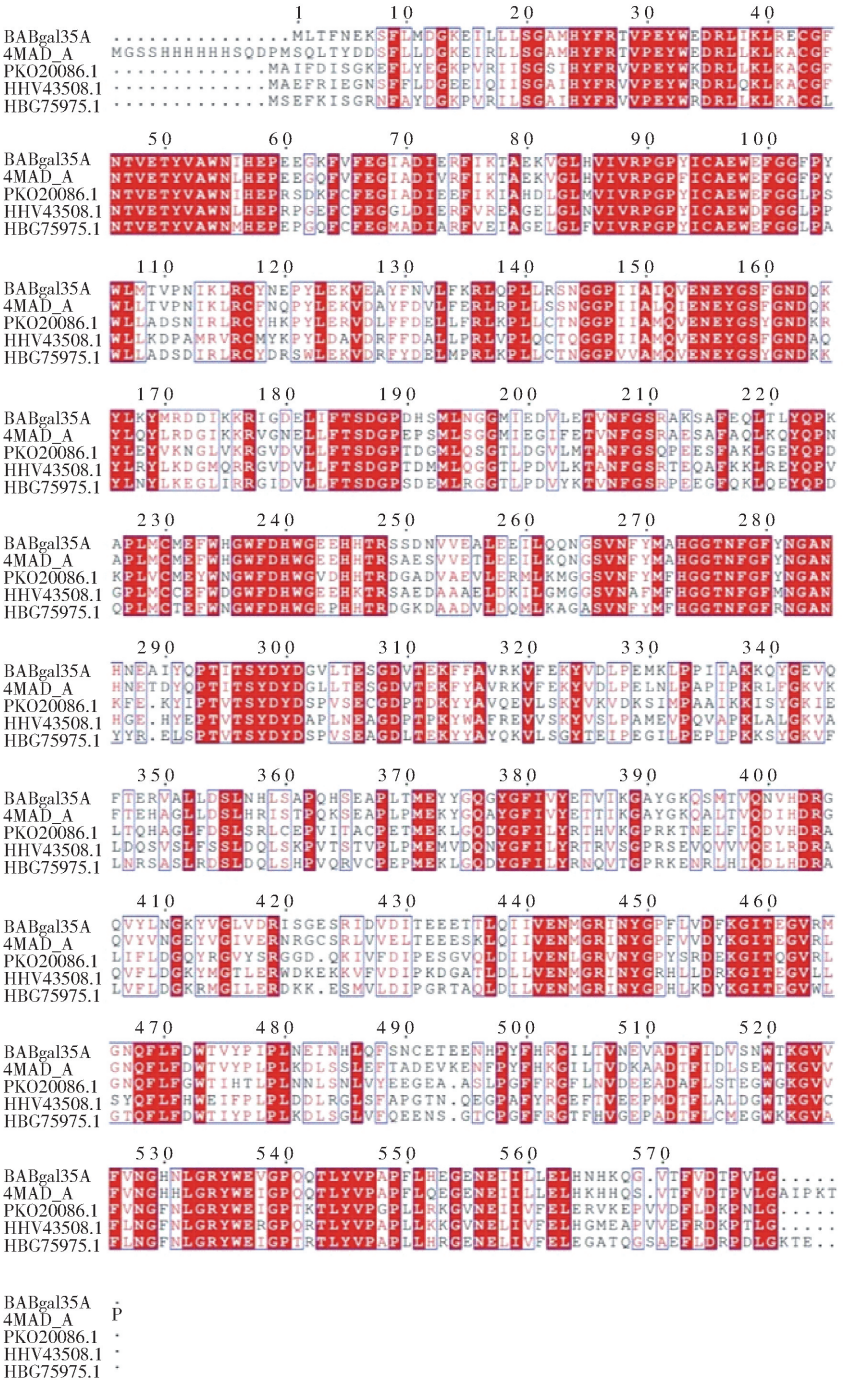
1.4 数据处理

采用 Origin 8.5 进行数据统计和图片处理,所有实验均重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 BABgal35A 的克隆与序列分析

芽孢杆菌来源的 BABgal35A 全长为 1 740 bp, 编码 579 个氨基酸。利用 ExPASy ProtParam tool 预测其分子质量和等电点, 分别为 66.6 kDa 和 4.99。NCBI-BLAST 分析表明(图 1), BABgal35A 与环状芽孢杆菌来源的 GH35 家族 β -半乳糖苷酶(Genbank no. 4MAD_A)^[19] 同源性最高, 为 79.9%。其次, 与



多重序列比对的序列分别为 BABgal35A 及环状芽孢杆菌(4MAD_A)、候选菌门 BRC1 细菌 HGW-BRC1-1(PKO20086.1)、厚壁菌门细菌(HHV43508.1)和梭菌目细菌(HBG75975.1)来源的 β -半乳糖苷酶的氨基酸序列。相同的残基在红色背景上显示为白色,保守残基在白色背景上显示为红色。

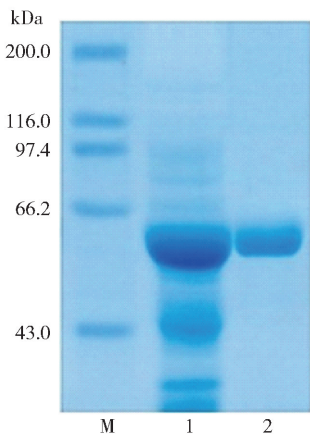
图 1 BABgal35A 与其他 β -半乳糖苷酶氨基酸序列的多重序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of amino acid sequences of BABgal35A and other β -galactosidases

候选菌门 BRC1 细菌 HGW-BRC1-1 (candidate division BRC1 bacterium HGW-BRC1-1, Genbank no. PKO20086.1)^[20]、厚壁菌门细菌(*Firmicutes bacterium*, Genbank no. HHV43508.1)^[21] 以及梭菌目细菌(*Clostridiales bacterium*, Genbank no. HBG75975.1)^[22] 来源的 β-半乳糖苷酶的同源性分别为 56.3%、56.0% 和 55.4%。因此,BABgal35A 可能是一个新型的 GH35 家族 β-半乳糖苷酶。

2.2 BABgal35A 的表达和纯化分析

BABgal35A 在大肠杆菌中可溶表达。粗酶液和经过 Ni-IDA 纯化后的酶液组成的 SDS-PAGE 电泳分析结果如图 2。由图 2 可知,纯酶的分子质量约为 60 kDa,与预测的分子质量接近。BABgal35A 的纯化实验结果见表 1。表 1 显示,酶活力的回收率为 88.3%,纯化倍数为 5.0。



泳道 M 为高分子质量标准蛋白,泳道 1 为粗酶液,泳道 2 为纯酶。

图2 BABgal35A 的纯化电泳分析结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified BABgal35A

表1 BABgal35A 纯化结果

Tab.1 Purification result of recombinant BABgal35A

纯化步骤	总酶活力 ^a /U	m(总蛋白) ^b /mg	比酶活/(U·mg ⁻¹)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	94.8	207.8	0.5	1.0	100.0
Ni-IDA	83.7	33.4	2.5	5.0	88.3

^a 表示酶活力的测定是在 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液(pH 值为 5.0)中,以 5 mmol/L β-oNPGal 为底物,55℃反应 10 min;^b 表示蛋白质含量用 Lowry 法测定,以牛血清蛋白(BSA)为标准。

目前已报道的 β-半乳糖苷酶分子质量一般在 50~180 kDa,BABgal35A 的分子质量约为 60 kDa,与蜜源芽孢杆菌来源的 β-半乳糖苷酶(57 kDa)^[23] 同属于低分子质量的 β-半乳糖苷酶。BABgal35A 的分子质量低于大多数 GH 35 家族的 β-半乳糖苷

酶,如土壤宏基因组的 Bgal_144-3 (65.6 kDa) 和 Bgal_375 (112 kDa)^[24],以及产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*) 31B 来源的 3 个 β-半乳糖苷酶^[25] (115、110、120 kDa)。

2.3 BABgal35A 的酶学性质分析

BABgal35A 的酶学性质研究结果见图 3。BABgal35A 的最适 pH 值为 5.0[图 3(a)],用不同缓冲液处理 30 min 后,该酶在 pH 值为 4.5~8.0 的缓冲液中仍能保持 80% 以上的酶活力[图 3(b)]。该酶的最适温度为 55℃[图 3(c)],在 20~45℃处理 30 min,残余酶活力仍高于 80%[图 3(d)]。在不同温度下处理酶,测得该酶在 40、45、50℃的半衰期分别为 605、85、15 min[图 3(e)]。

大多数微生物来源的 β-半乳糖苷酶最适 pH 值为 3.0~8.5^[6],其中,芽孢杆菌来源的 β-半乳糖苷酶最适 pH 值多数在中性范围内(6.0~8.0)^[8-13]。GH 35 家族的 β-半乳糖苷酶最适 pH 值大多在酸性范围内,本研究中,BABgal35A 的最适 pH 值为 5.0[图 3(a)],与土壤宏基因组^[24] 和产黄青霉菌 31B^[25] 来源 GH35 家族的 Bgal_137 和 PcBGAL35B 最适 pH 值相同,低于 Bgal_144-3 (pH 值为 6.0) 和 PcBGAL35C (pH 值为 5.5) 的最适 pH 值。BABgal35A 在 pH 值为 4.5~8.0 时,40℃处理 30 min 仍保持 80% 以上的酶活力[图 3(b)],具有较宽的酸碱稳定范围,优于巴伦葛兹类芽孢杆菌(pH 值为 6.0~8.0)^[14]、阿耶波多氏芽孢杆菌(pH 值为 5.0~7.0)^[10] 和米曲霉(pH 值为 5.0~7.5)^[26] 等来源的 β-半乳糖苷酶。该酶最适温度为 55℃[图 3(c)],在 20~45℃保持稳定[图 3(d)]。已报道的 β-半乳糖苷酶最适温度在 20~105℃,BABgal35A 的最适温度处于中等水平,比巴伦葛兹类芽孢杆菌(45℃)^[14] 来源的 β-半乳糖苷酶要高,低于芽孢杆菌(60℃)^[13] 来源的 β-半乳糖苷酶。不同来源的 β-半乳糖苷酶的热稳定性差异较大,BABgal35A 的热稳定性范围比米曲霉(<40℃)^[26] 和乳酸克鲁维酵母(<40℃)^[27] 来源的 β-半乳糖苷酶宽,与巴伦葛兹类芽孢杆菌(<45℃)^[14] 来源的 β-半乳糖苷酶相近。而蜜源芽孢杆菌^[23] 来源的 β-半乳糖苷酶热稳定性更好,在 70℃以下保持稳定。

BABgal35A 的底物特异性分析结果见表 2。在最适条件下,该酶对 β-oNPGal 的水解活性最高(100%),其余依次为 β-pNPGal、pNP-Fuc 和乳糖,对其他底物没有水解活性。BABgal35A 对

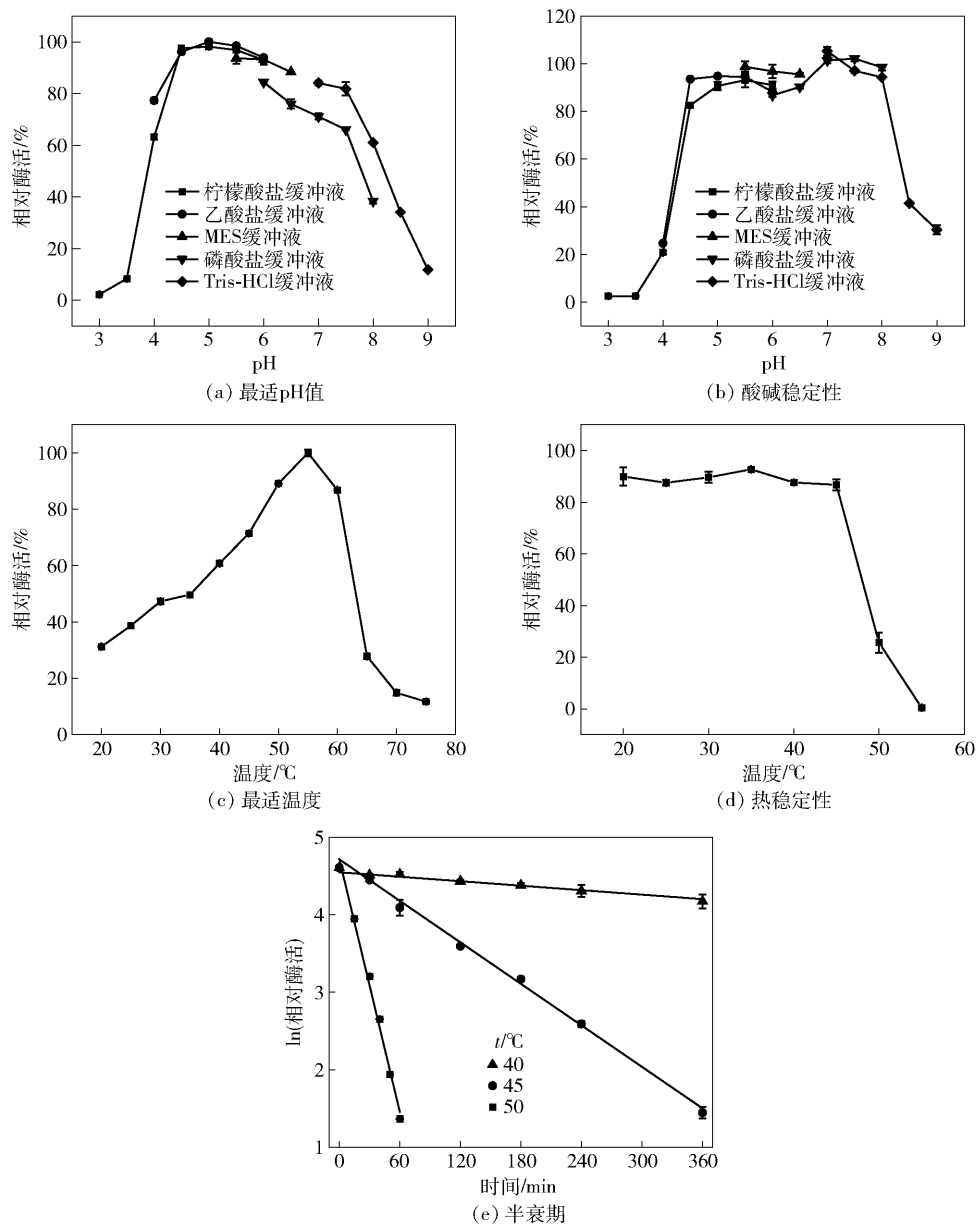


图3 BABgal35A 的酶学性质

Fig.3 Enzymatic properties of BABgal35A

表2 BABgal35A 的底物特异性

Tab.2 Substrate specificity of BABgal35A

底物	比酶活力 ^a /(U·mg ⁻¹)	相对酶活力 ^b /%	底物	比酶活力 ^a /(U·mg ⁻¹)	相对酶活力 ^b /%
β-oNPGal	2.50 ± 0.05	100.0	β-pNPGlcNAc	ND	ND
β-pNPGal	1.17 ± 0.01	45.4	α-pNPGal	ND	ND
pNP-Fuc	0.92 ± 0.05	35.6	α-pNPGlu	ND	ND
β-pNPXyl	ND	ND	乳糖	0.18 ± 0.01	7.1
β-pNPMan	ND	ND	β-pNPGlu	ND	ND

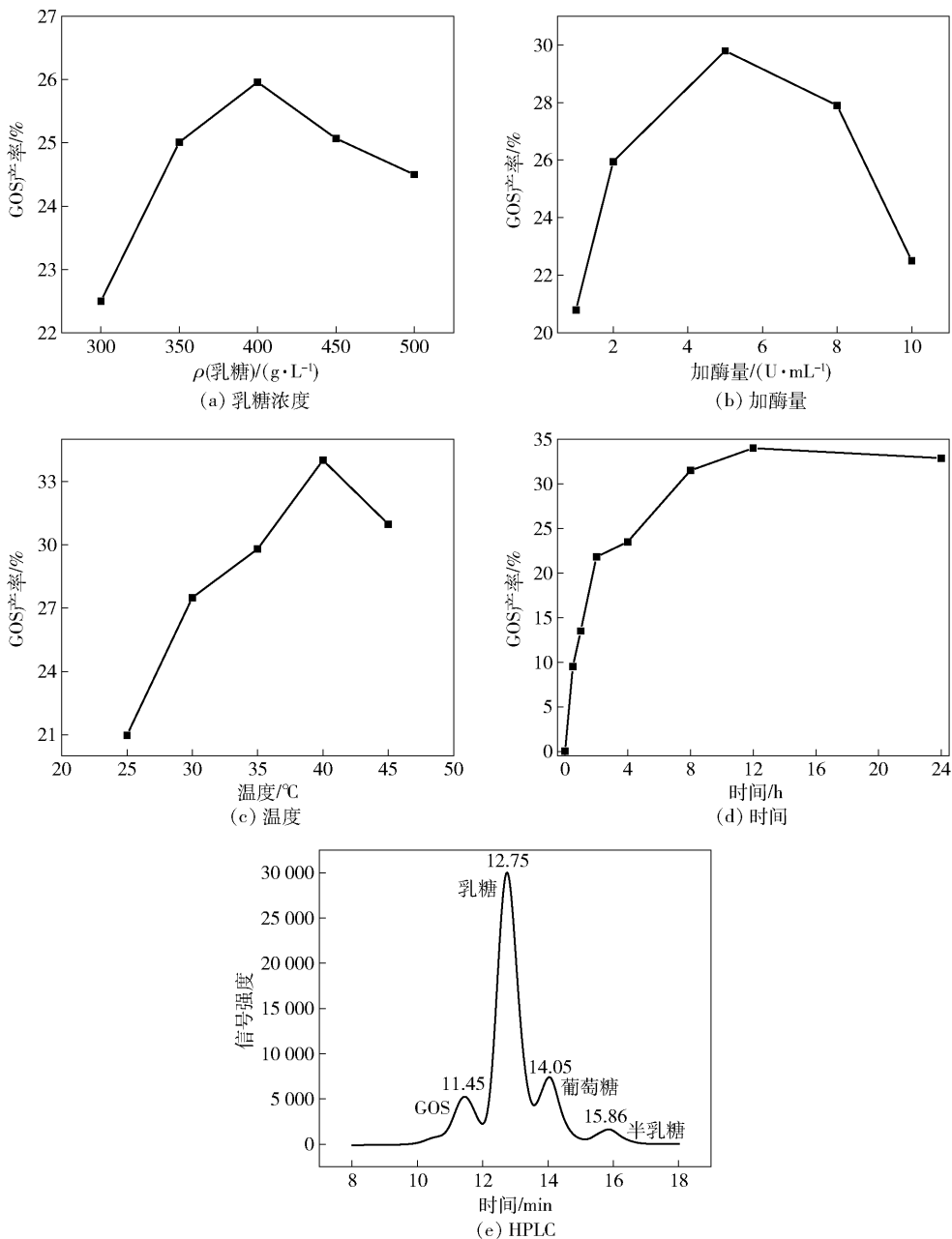
^a表示酶活力的测定是在50 mmol/L 乙酸盐缓冲液(pH 值为5.0)中,以5 mmol/L β-oNPGal 等为底物,55 ℃反应10 min;^b表示以β-oNPGal 为底物的BABgal35A 酶活力为对照(100%);ND表示未检测到酶活力。

β -oNPGal 的 K_m 和 V_{max} 值分别为 1.14 mmol/L 和 21.53 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。BABgal35A 对 3 种人工底物具有水解活性,同时具有 β -半乳糖苷酶和岩藻糖苷酶活性,相较于多数 β -半乳糖苷酶具有优势。如巴伦葛兹类芽孢杆菌^[18]和深海交替单胞菌 ML52 (deep-sea Bacterium *Alteromonas* sp. ML52)^[28]来源的 β -半乳糖苷酶都只具有 β -半乳糖苷酶活性而不具有岩藻糖苷酶活性。因此,BABgal35A 具有广泛

的底物特异性,应用前景广阔。

2.4 BABgal35A 合成低聚半乳糖的优化结果

乳糖浓度、加酶量、反应温度以及时间对 BABgal35A 合成 GOS 产率的影响,实验结果如图 4。当乳糖质量浓度为 400 g/L 时,GOS 产率(26%)达到最高[图 4(a)]。当底物质量浓度为 400 g/L 的乳糖时,GOS 的产率随着加酶量的增加先快速增加而后出现明显下降,5 U/mL 是 BABgal35A 合成 GOS 的



图(e)表示利用 50 mmol/L 乙酸盐缓冲液(pH 值为 5.0)配制质量浓度为 400 g/L 的乳糖溶液,加入 5 U/mL 的 BABgal35A,40 ℃ 反应 12 h 后,产物的 HPLC。

图 4 BABgal35A 合成 GOS 的最适条件和 HPLC 分析结果

Fig. 4 Optimal conditions for synthesis of GOS by BABgal35A and results of HPLC

最适加酶量[图 4(b)]。温度显著影响 GOS 的产率,当温度从 25 ℃ 提高到 40 ℃ 时,GOS 的产率呈上升趋势,而进一步提高温度,GOS 的产率下降,因此,GOS 的产率在 40 ℃ 时达到最高,为 34% [图 4(c)]。在优化条件下,随着反应时间的增加,GOS 产率明显增加,反应进行到 12 h 时达到最高,产率为 34%,随着反应继续进行,GOS 含量下降 [图 4(d)]。

目前,已有多种 β -半乳糖苷酶用于 GOS 的合成,产率通常在 12% ~ 50%^[13-14,27,29-31]。Hsu 等^[30] 对长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) BCRC15708 来源的 β -半乳糖苷酶进行表达,以质量浓度为 400 g/L 的乳糖为底物,反应 10 h 后 GOS 产率达 32.5%。Arreola 等^[31] 利用短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) DSM 20213 来源的 β -半乳糖苷酶合成 GOS,产率最高为 33%。本研究中, β -半乳糖苷酶 (BABgal35A) 利用乳糖为底物合成 GOS 的产率达 34% [图 4(d)],与长短两种双歧杆菌来源的 β -半乳糖苷酶合成 GOS 的产率相近,处于较高水平。其产率高于乳酸克鲁维酵母 (12.2%) 和米曲霉 (26.7%) 来源的 β -半乳糖苷酶^[27,29],而低于巴伦葛兹类芽孢杆菌 (47.9%) 来源的 β -半乳糖苷酶^[14]。因此,芽孢杆菌来源的 BABgal35A 是一种高效合成 GOS 的 β -半乳糖苷酶,可以作为 GOS 工业化生产的选择。

3 结 论

实现了一种芽孢杆菌来源的新型 β -半乳糖苷酶基因 (*BABgal35A*) 在大肠杆菌中的可溶性表达,并对其酶学性质进行了表征。BABgal35A 的最适 pH 值为 5.0,温度为 55 ℃,在 pH 值为 4.5 ~ 8.0 时具有良好的酸碱稳定性。BABgal35A 具有广泛的底物特异性。在最适条件下,BABgal35A 合成 GOS 的产率达 34%,处于较高水平。本研究为酶法合成 GOS 提供了更多选择。此外,为进一步提高 BABgal35A 合成 GOS 的产率,可以对该酶进行分子改造,例如定向进化和理性设计等。

参考文献:

[1] DEPEINT F, TZORTZIS G, VULEVIC J, et al. Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum*

NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 87(3): 785 - 791.

- [2] 孙宝国,刘慧琳. 健康食品产业现状与食品工业转型发展[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(2): 1 - 6.
SUN B G, LIU H L. Current situation of healthy food industry and transformation and development of food industry[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(2): 1 - 6.
- [3] CHEN Q C, LIU M, ZHANG P Y. Fucoidan and galactooligosaccharides ameliorate high-fat diet-induced dyslipidemia in rats by modulating the gut microbiota and bile acid metabolism[J]. Nutrition, 2019, 65: 50 - 59.
- [4] AMBROGI V, BOTTACINI F, CAO L, et al. Galactooligosaccharides as infant prebiotics: production, application, bioactive activities and future perspectives [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 63(6): 1 - 14.
- [5] VERA C A, CORDOVA C, ABURTO C, et al. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(12): 1 - 20.
- [6] MOVAHEDPOUR A, AHMADI N, GHALAMFARSA F, et al. β -Galactosidase: from its source and applications to its recombinant form[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2021, 69: 612 - 628.
- [7] VERA C, GUERREROB C, ABURTOB C. Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-proteins and proteomics, 2020, 1868(1): 140 - 271.
- [8] LIU P, WU J W, LIU J, et al. Engineering of a β -galactosidase from *Bacillus coagulans* to relieve product inhibition and improve hydrolysis performance[J]. Journal of Dairy Science, 2022, 104(10): 10566 - 10575.
- [9] KURIBAYASHI L M, RIBEIRO V P D, DE SANTANA R C, et al. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(9): 3601 - 3610.
- [10] LUAN S Y, DUAN X G. A novel thermal-activated β -galactosidase from *Bacillus aryabhattai* GEL-09 for lactose hydrolysis in milk [J]. Foods, 2022, 11(3): 372.
- [11] LI N, LIU Y, WANG C Y, et al. Overexpression and characterization of a novel GH4 galactosidase with β -galactosidase activity from *Bacillus velezensis* SW5

- [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(9): 9465 – 9477.
- [12] ZHOU Z H, HE N N, HAN Q, et al. Characterization and application of a new β -galactosidase Gal42 from marine bacterium *Bacillus* sp. BY02[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 742300.
- [13] HAN M M, XU C X, GUAN B, et al. Enhanced thermal stability of the β -galactosidase BgaB from *Bacillus circulans* by cyclization mediated via SpyTag/SpyCatcher interaction and its use in galactooligosaccharides synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222: 2341 – 2352.
- [14] LIU Y, CHEN Z, JIANG Z, et al. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104: 1055 – 1063.
- [15] GAO X, WU J, WU D. Rational design of the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to improve galactooligosaccharide production[J]. Food Chemistry, 2019, 286: 362 – 367.
- [16] 张伟, 张宇宏, 刘波, 等. 一种具有高转糖苷活性的 β -半乳糖苷酶组合突变体及其制备方法和应用: CN107267486A[P]. 2017 – 10 – 20.
- ZHANG W, ZHANG Y H, LIU B, et al. The invention relates to a β -galactosidase combination mutant with high transgalactosylation activity, preparation method and application thereof: CN107267486A[P]. 2017 – 10 – 20.
- [17] RODRIGUEZCOLINAS B, ABREU M A D, FERNANDEZARROJO L, et al. Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19): 10477 – 10484.
- [18] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265 – 275.
- [19] HENZE M, YOU D J, KAMERKE C, et al. Rational design of a glycosynthase by the crystal structure of β -galactosidase from *Bacillus Circulans* (bgac) and its use for the synthesis of N-acetyllactosamine type 1 glycan structures[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 191: 78 – 85.
- [20] HERNSDORF A W, AMANO Y, MIYAKAWA K, et al. Potential for microbial H₂ and metal transformations associated with novel bacteria and archaea in deep terrestrial subsurface sediments[J]. ISME Journal, 2017, 11(8): 1915 – 1929.
- [21] CAMPANARO S, TREU L, RODRIGUEZ-R L M, et al. New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1): 1 – 18.
- [22] PARKS D H, CHUVOCHINA M, WAITE D W, et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(10): 1 – 9.
- [23] 李云, 朱少华, 管政兵, 等. 产耐热 β -半乳糖苷酶蜜源芽孢杆菌的鉴定及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(7): 49 – 57.
- LI Y, ZHU S H, GUAN Z P, et al. Identification of thermostable β -galactosidase-producing *Bacillus* strain from honey and enzymatic properties[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(7): 49 – 57.
- [24] LIU P, WANG W, ZHAO J, et al. Screening novel β -galactosidases from a sequence-based metagenome and characterization of an alkaline β -galactosidase for the enzymatic synthesis of galactooligosaccharides[J]. Protein Expression and Purification, 2019, 155: 104 – 111.
- [25] KONDO T, NISHIMURA Y, MATSUYAMA K, et al. Characterization of three GH35 β -galactosidases, enzymes able to shave galactosyl residues linked to rhamnogalacturonan in pectin, from *Penicillium chrysogenum* 31B[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(3): 1135 – 1148.
- [26] 董自星, 贾超, 王君, 等. 米曲霉 β -半乳糖苷酶系的克隆表达与酶学特性分析[J]. 食品工业科技, 2016, 37(21): 172 – 177.
- DONG Z X, JIA C, WANG J, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(21): 172 – 177.
- [27] GONZALEA-DELGADO I, LOPEZ-MUOZ M J, MORAKES G, et al. Optimization of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*[J]. International Dairy Journal, 2016, 61: 211 – 219.
- [28] SUN J J, YAO C Y, WANG W, et al. Cloning, expression and characterization of a novel cold-adapted β -galactosidase from the deep-sea Bacterium *Alteromonas* sp. ML52[J]. Marine Drugs, 2018, 16(12): 469.
- [29] CINAR K, GUNES G, GULEC H A. Enzymatic synthesis of prebiotic carbohydrates from lactose: kinetics and

- optimization of transgalactosylation activity of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* [J]. Journal of Food Process Engineering, 2020, 43(8): 1–12.
- [30] HSU C A, LEE S L, CHOU C C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC15708 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2225–2230.
- [31] ARREOLA S L, INTANON M, SULJIC J, et al. Two β -galactosidases from the human isolate *Bifidobacterium breve* DSM 20213; molecular cloning and expression, biochemical characterization and synthesis of galactooligosaccharides[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104056.

Characterization of GH Family 35 β -Galactosidase from *Bacillales* sp. and Its Application in Synthesis of Galactooligosaccharides

WANG Jianyu¹, LI Ting¹, LI Jing², JIANG Zhengqiang², YAN Qiaojuan^{1,*}

(1. College of Engineering/Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Galactooligosaccharides are important prebiotics. β -Galactosidases from *Bacillales* sp. can catalyze the transfer of galactoside, which can be used for the synthesis of galactooligosaccharides. The expression, enzymatic properties and application in the synthesis of galactooligosaccharides of a novel β -galactosidase from *Bacillales* sp. were investigated. A glycoside hydrolase (GH) family 35 β -galactosidase gene (*BABgal35A*) from *Bacillales* sp. was cloned and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The results of multiple sequence alignment showed that *BABgal35A* shared the highest identity of 79.9% with a β -galactosidase from *Bacillus circulans*, and was a novel β -galactosidase (named *BABgal35A*). Crude enzyme was purified through Ni-IDA affinity chromatography to obtain electrophoresis-grade pure enzyme. SDS-PAGE showed that the molecular weight of purified enzyme was about 60 kDa. The optimal pH and temperature of *BABgal35A* were determined to be 5.0 and 55 °C, respectively. The enzyme was stable at pH 4.5–8.0 and temperature 20–45 °C. *BABgal35A* exhibited the highest specific activity towards *o*NP- β -galactopyranoside. A maximum yield of 34% for galactooligosaccharides production was obtained by *BABgal35A* using lactose as substrate. The study showed that a GH family 35 β -galactosidase from *Bacillales* sp. was potentially suitable for the preparation of galactooligosaccharides.

Keywords: *Bacillales* sp.; β -galactosidase; functional oligosaccharides; enzymatic properties; galactooligosaccharides

(责任编辑:叶红波)