产耐热 β-半乳糖苷酶蜜源芽孢杆菌的鉴定及酶学性质

李 云[1,2]，朱少华[1,2]，管政兵[1,2]，蔡宇杰[1,2]，廖祥儒*[1,2]
（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：从分离自蜂蜜的芽孢杆菌中筛选到一株高产 β-半乳糖苷酶的菌株，鉴定为地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*），并命名为 *Bacillus licheniformis* SYBC hb15。纯化该酶并研究其酶学性质，以邻硝基酚-β-D-半乳糖苷（ONPG）为底物，*B. licheniformis* SYBC hb15 所产 β-半乳糖苷酶的最适水解反应温度是 60 ℃；70 ℃放置 60 min 后酶活力仍保留 65%，具有较高的热稳定性；与嗜热菌 *Talaromyces thermophilus* 来源的 β-半乳糖苷酶相比，葡萄糖对其水解活性的抑制较弱。因此，*B. licheniformis* SYBC hb15 所产的 β-半乳糖苷酶具有较高的热稳定性和葡萄糖耐受性，有很好的工业应用潜力。

关键字：β-半乳糖苷酶；酶学性质；地衣芽孢杆菌
中图分类号：Q 815　**文章编号：**1673-1689(2019)07-0049-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.007

Identification of Thermostable β-Galactosidase-Producing *Bacillus* Strain from Honey and Enzymatic Properties

LI Yun[1,2]，*ZHU Shaohua*[1,2]，*GUAN Zhengbing*[1,2]，*CAI Yujie*[1,2]，*LIAO Xiangru*[*1,2]
（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: A β-galactosidase-producing strain was screened from bacillus species isolatated from honey. The strain was identified as *Bacillus licheniformis* by an in-depth study and named as Bacillus licheniformis SYBC hb15. β-galactosidase expressed by *Bacillus licheniformis* SYBC hb15 was purified for the study of enzymatic properties using o-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG) as substrate. The result showed that the optimal reactive temperature of the β-galactosidase was 60 ℃, and it had high thermal stability when incubating the enzyme at 70 ℃ for 60 min with 65% residual activity. Compared to that of the enzyme from *Talaromyces thermophilus*, glucose presents less inhibition to the hydrolytic activity of the β-galactosidase. Therefore, the β-galactosidase produced by *B. licheniformis* SYBC hb15 has good potential in the industrial application because of its high thermostability and resistance to glucose of high levels.

Keyword: β-galactosidase, enzymatic properties, *Bacillus licheniformis*

收稿日期：2017-01-15
基金项目：江苏省产学研前瞻项目（BY2014023-28）；无锡市科技发展农业支撑项目（CLE01N1310）。
*** 通信作者：**廖祥儒（1964—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物催化与转化生物学方面的研究。E-mail：xrliao@jiangnan.edu.cn
引用本文：李云，朱少华，管政兵. 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(07)：49-57.

β-半乳糖苷酶（β-galactosidase, EC 3.2.1.23），又称乳糖酶(Lactase)，是一种重要的生物催化剂，具有催化乳糖水解和转糖苷两种重要的功能。工业上常利用其水解活性来减少乳制品中的乳糖含量及废水处理，具有重要的工业应用价值。β-半乳糖苷酶广泛存在于动物、植物及微生物中[1-2]。细菌、霉菌、酵母等微生物均有β-半乳糖苷酶的发现[2]，而在乳酸菌、大肠杆菌和芽孢杆菌[3-4]等细菌中分布最为广泛。目前，来源于微生物的β-半乳糖苷酶备受关注，因具有酶源丰富、产量高、生产成本低、周期短等特点，而且生产不受季节、地理位置等因素的影响等[5]。因此，与其它来源相比，微生物来源的β-半乳糖苷酶在工业应用中极具优势。例如，乳品工业用于分解乳糖的β-半乳糖苷酶多来源于酵母、米曲霉、黑曲霉或乳酸菌。但以上来源的β-半乳糖苷酶往往存在稳定性差[6]以及酶活易受到降解产物葡萄糖或半乳糖的抑制，会限制β-半乳糖苷酶的工业应用[7-8]。因此，筛选具有高稳定性、耐受高浓度葡萄糖或半乳糖的β-半乳糖苷酶十分必要。

近年来，耐热β-半乳糖苷酶在乳制品生产中具有显著优势，并逐渐引起人们的研究兴趣。一般把最适温度在50 ℃以上的β-半乳糖苷酶称作耐热β-半乳糖苷酶。例如，来源于嗜热菌和霉菌的乳糖酶就具有较高的反应温度[9]。对芽孢杆菌来源的β-半乳糖苷酶的研究也逐步深入，已发现的特性有高转糖基活性、热稳定性及pH稳定性[10-13]。除了热稳定性外，耐高浓度葡萄糖或半乳糖抑制的β-半乳糖苷酶也是应用中急需的，而这方面的工作尚不深入[8]。有研究表明，蜂蜜来源的芽孢杆菌产生的果聚糖合酶具有较好的高糖耐受性[14]。Esawy的研究认为，蜂蜜是葡萄糖和果糖构成的糖过饱和溶液，其中分离的芽孢杆菌及其产生的酶等生物大分子很可能具有较好的糖耐受性。因此，作者以分离自蜂蜜的芽孢杆菌为资源，从中得到能够产耐高浓度单糖的β-半乳糖苷酶的安全菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 作者所在实验室保藏蜜源菌，是从蜂蜜中分离得到的芽孢杆菌菌株。

1.1.2 试剂 乳糖、胰蛋白胨、酵母膏、$ZnCl_2$、NaCl、KH_2PO_4、$K_2HPO_4\cdot3H_2O$、$CaCl_2\cdot2H_2O$、$CuCl_2\cdot2H_2O$、$MgCl_2\cdot6H_2O$、$BaCl_2\cdot2H_2O$、KCl、$MnCl_2\cdot4H_2O$、$NiSO_4\cdot6H_2O$及$CoCl_2\cdot6H_2O$：均为国产分析纯试剂；邻硝基酚β-D-半乳糖苷(ONPG)、邻硝基酚(ONP)：购买于上海生工；考马斯亮蓝R250：上海化学试剂公司进口分装。

1.1.3 仪器与设备 紫外可见分光光度计UV-6000 METASH：上海元析仪器有限公司产品；PCR仪：美国Applied Biosystems产品；DYY-8C电泳仪、DNA水平电泳槽：北京六一仪器厂；立式蒸气压力灭菌锅：YXQ-LS-50上海博迅公司产品；组合式摇床：太仓市强乐实验设备有限公司产品；培养箱：LRH-250广东省医疗器械厂；恒温水浴锅：常州中诚仪器制造有限公司；超净工作台：苏州净化设备有限公司；JG-1A型高压细胞破碎机：宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种鉴定

1)形态学和生理生化特征鉴定：将待测菌株划线于LB固体培养基，在30 ℃下培养2 d，利用电子显微镜观察菌株的形态。根据《伯杰细菌手册》、《常见细菌鉴定手册》和《微生物学实验教程》(第二版)中的方法对其生理生化特性进行测定。

2)16S rRNA基因鉴定：采用16S rRNA基因序列分析法，按试剂盒说明提取细菌DNA并以通用引物F27（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）和R1492(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3)扩增细菌16S rRNA基因，扩增产物交由生工生物工程(上海）有限公司进行测序，序列测定结果通过BLAST进行同源比对分析，选取高同源性序列，利用MEGA4.0软件构建系统发育树。系统发育树的构建中采用邻接法(Neighbor-Joining method)，并重复取样1 000次进行自展值(bootstrap value)分析，以评估系统发育树的置信度，确定菌种在进化过程中的位置[15]。

1.2.2 β-半乳糖苷酶活力的测定

1）粗酶液的制备：芽孢杆菌hb15液态发酵48 h后，取发酵液15 mL，于4 ℃、8 000 r/min离心10 min，收集菌体，用0.1 mol/L、pH 7.0磷酸缓冲液洗涤两次。采用高压破碎，再于4 ℃、8 000 r/min离心10 min，上清液作为进一步实验的粗酶液。

2）酶活的测定：采用ONPG法，0.5 mL、pH 7.0的磷酸缓冲液和1.5 mL 0.25%的ONPG加入试管，

30 ℃预热 5 min，加入 1 mL 适当稀释的粗酶液，反应 30 min 后，加入 1 mL 10% Na_2CO_3 终止反应，用分光光度计测定吸光值（在波长 420 nm 处），以磷酸缓冲液代替酶液作对照[16]。

酶活定义：在上述条件下，1 min 催化水解 ONPG 生成 1 μmol ONP 的量，定义为 1 U。

通过对硝基苯酚标准曲线方程 Y=0.828 3X−0.001 2（R^2=0.999 9），以吸光度（OD 值）为纵坐标 Y，ONP 浓度为横坐标 X 计算酶活。

1.2.3　酶的纯化和酶学性质的测定

1）酶的纯化：将粗酶液经过硫酸铵分级盐析、HiTrap Q HP 离子交换层析和 Superdex G-200 10/300 GL 凝胶过滤层析等方法进行分离纯化，得到纯酶，研究其酶学性质。

2）β-半乳糖苷酶的最适反应温度：将酶液分别在 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 ℃下与底物进行反应，然后参照 1.2.2 所述测定其酶活力，以最高酶活定义为 100%，分别计算不同温度条件下 β-半乳糖苷酶的相对酶活。

3）β-半乳糖苷酶的热稳定性：将酶液在 30、40、50、60、70、80 ℃下分别放置 0.5、1.0、1.5、2.0 h，然后参照 1.2.2 所述测定其剩余酶活力，以初始酶活定义为 100%，分别计算不同温度条件下放置不同时间的 β-半乳糖苷酶的相对酶活。

4）β-半乳糖苷酶的最适反应 pH：在最适温度条件下，测定 β-半乳糖苷酶在不同 pH 值（3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0）下的酶活。将最高的酶活力定义为 100%，分别计算不同 pH 值条件下 β-半乳糖苷酶的相对酶活。

5）β-半乳糖苷酶的 pH 稳定性：将酶液的 pH 分别调至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0，于 4 ℃下放置 4.0、8.0、12.0、16.0 h 后，再将酶液 pH 调至最适 pH，然后参照 1.2.2 所述在最适温度和最适 pH 条件下测定其酶活，分别计算不同 pH 条件下放置不同时间 β-半乳糖苷酶的相对酶活。

6）金属离子对 β-半乳糖苷酶的影响：酶液中分别加入不同的金属离子（Na^+、K^+、Co^{2+}、Cu^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Ba^{2+}、Ni^{2+}），使其终浓度为 2 mmol/L，4 ℃下放置 5 min 后，在最适温度和最适 pH 下测定酶活力，将不添加离子的酶活力定义为 100%，分别计算不同离子条件下 β-半乳糖苷酶的相对酶活性，考察金属离子对酶活的影响。

7）酶反应的动力学常数：在最适的反应温度和 pH 条件下，酶液与不同浓度的底物反应，其中 ONPG 的浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mmol/L，参照 1.2.2 所述测定 β-半乳糖苷酶水解酶活，之后采用 Linewear-Burk 双倒数作图，研究该 β-半乳糖苷酶催化 ONPG 水解的反应动力学常数，求出 β-半乳糖苷酶水解活性的动力学常数 K_m 和 V_{max}。

2　结果与讨论

2.1　菌种鉴定

对实验室保藏的 127 株蜜源菌，利用 X-gal 平板筛选培养基初筛，30 ℃培养箱静置培养后观察，看是否有蓝色菌落出现。初筛得到 3 株菌，之后以 ONPG 为底物测酶活复筛，见表 1。最终选取一株产 β-半乳糖苷酶高的菌株，其编号 hb15，对其进行菌种鉴定。

表 1　各菌株酶活

Table1　β-galactosidase activity of each strain

菌株	酶活/(U/L)
hb15	212.7
hb26	54.3
hb71	191.4

2.1.1　形态学和生理生化特征鉴定

菌株 hb15 在 LB 培养基上形成圆形菌落，边缘不整齐，生长初期表面光滑，后期表面粗糙，有褶皱，菌体杆状，革兰氏染色阳性，大小为 0.8 μm×1.5 μm，以端生鞭毛运动，形成芽孢。其生理生化特征见表 2。

表 2　菌株 hb15 的生理生化特征

Table 2　Physiological and biochemical characteristics of hb15

生化试验项目	结果	生化试验项目	结果
葡萄糖	+	MR 试验	+
蔗糖	+	吲哚试验	+
乳糖	+	柠檬酸盐利用实验	−
VP 试验	+	苯丙氨酸脱氢酶	−

注：+ Positive reaction；− Negative reaction

2.1.2　16S rRNA 基因克隆及其序列分析

PCR 扩增获得菌株 hb15 的 16S rRNA 核苷酸片段，大小为 1 438 bp。将其进行 BLAST 同源性序列比对，结果表明该序列与多个已发表的芽孢杆菌菌株的 16S rRNA 基因序列的相似性达到 99%以上，如 *Bacillus*

licheniformis Xmb047 和 *Bacillus licheniformis* ML103A。选取 7 株模式菌和两株序列相似度高的菌株，通过 MEGA4.0 软件进行聚类分析和进化树构建，结果见图 1。

结合该菌株的生理生化鉴定结果，确定该菌株为芽孢杆菌属中的地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*），命名为 *Bacillus licheniformis* SYBC hb15。

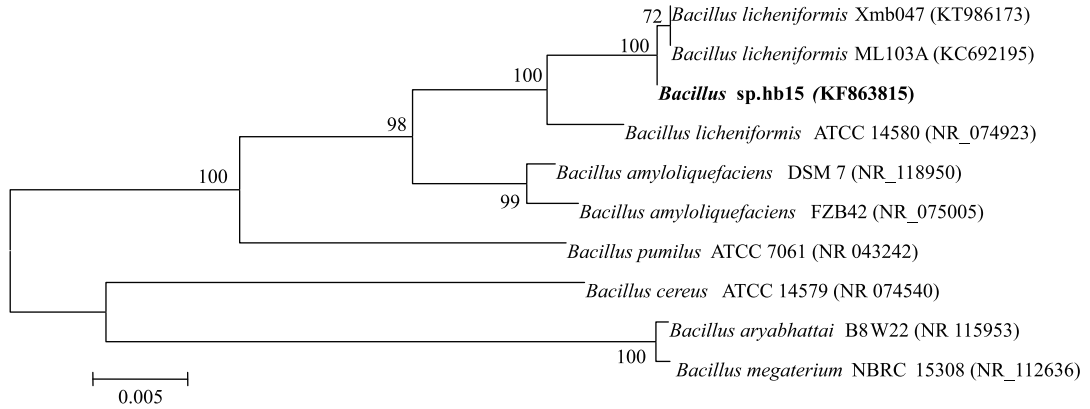


图 1　基于 16S rRNA 基因序列对目的细菌构建的系统进化树

Fig. 1　Phylogenetic tree of the target strain based on 16S rRNA gene-sequencing analysis

2.2　β-半乳糖苷酶的分离纯化

2.2.1　*硫酸铵饱和度的确定*　将粗酶液经不同饱和度的硫酸铵沉淀后，测定上清液 β-半乳糖苷酶活力，结果见图 2。

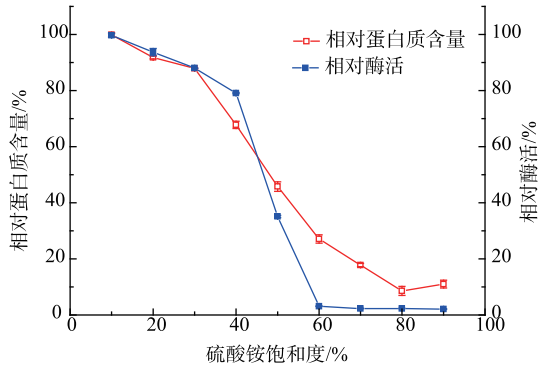


图 2　硫酸铵分级盐析

Fig. 2　Ammonium sulphate salt fractionation

由图 2 可知，硫酸铵饱和度低于 30%时，上清液中 β-半乳糖苷酶活力基本没有下降；饱和度高于 30%，上清液中的酶活开始下降，至 60%饱和度时基本检测不到 β-半乳糖苷酶活力，此时 β-半乳糖苷酶沉淀完全。因此，确定 β-半乳糖苷酶的硫酸铵分级盐析方法为：首先加入硫酸铵粉末至饱和度30%去除部分杂蛋白质，然后再添加硫酸铵粉末至饱和度 60%沉淀 β-半乳糖苷酶，用于后续的纯化。

2.2.2　*HiPrep™ 26/10 Desalting 对蛋白质进行脱盐*　将硫酸铵沉淀得到的蛋白质溶于小体积的磷酸盐缓冲液，用 HiPrep™ 26/10 Desalting 脱盐柱进行脱盐，脱盐柱是分子筛层析柱，β-半乳糖苷酶的脱盐柱层析见图 3。将有 β-半乳糖苷酶活力的活性峰收集，进行下一步的离子交换层析。

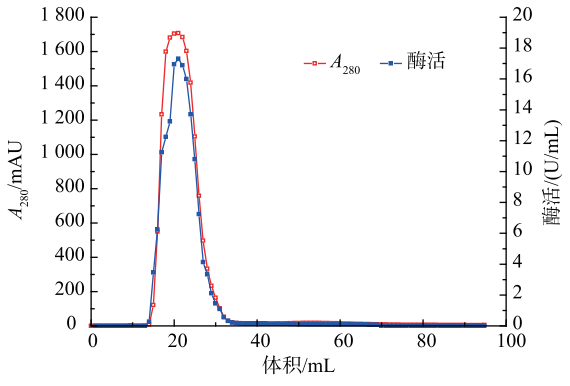


图 3　β-半乳糖苷酶的脱盐柱层析

Fig. 3　Hi PrepTM 26/10 Desalting for β-galactosidase

2.2.3　*离子交换柱层析*　据文献报道，细菌产 β-半乳糖苷酶的等电点在 5.7~6.0，pH 的稳定范围 6.0~8.0[17]，因此选择了阴离子交换柱 HiTrap Q HP 对 β-半乳糖苷酶进一步分离纯化，经优化条件选择缓冲液的 pH 为 7，此时 β-半乳糖苷酶带负电，上样之后结合到柱子上，梯度洗脱时随着盐离子的浓度增加酶被洗脱下来。

β-半乳糖苷酶经过阴离子交换柱层析结果见图 4。确定梯度洗脱，在 NaCl 质量浓度为 30 g/dL 时酶被洗脱下来，将具有 β-半乳糖苷酶活力的活性峰

收集，超滤管浓缩，4 ℃保存，待进行Superdex G-200分子筛层析。

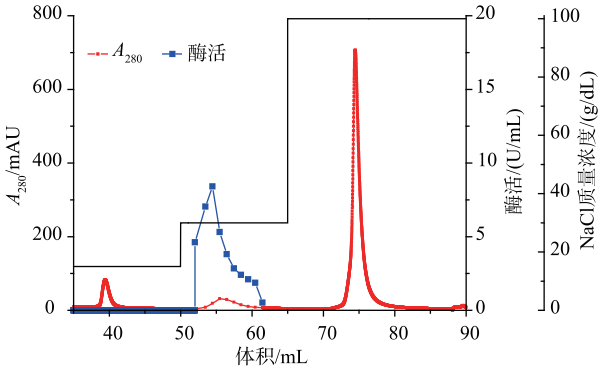


图 4　β-半乳糖苷酶的 HiTrap Q HP 离子交换层析

Fig. 4　HiTrap Q HP ion exchange chromatography for β-galactosidase

2.2.4　*凝胶过滤层析*　据文献报道，微生物 β-半乳糖苷酶的相对分子质量范围广，在 35 000~850 000 [18-19]，因此选择 Superdex G-200 10/300 GL 凝胶柱做进一步的分离纯化。如图 5 所示，对各洗脱峰的酶活测定，经检测洗脱体积 11~15 mL 处洗脱出的单峰具有 β-半乳糖苷酶酶活，收集活性峰，之后利用 SDS-PAGE 进行验证。

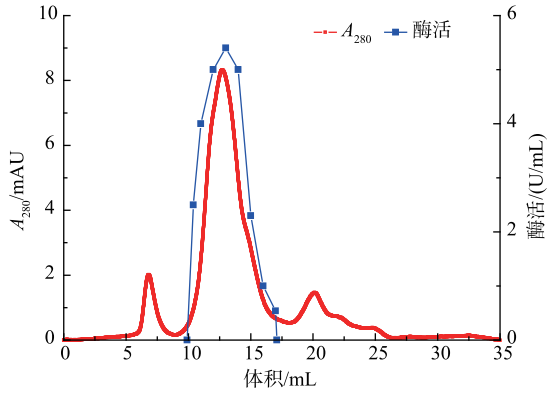


图 5　β-半乳糖苷酶的 superdex G-200 凝胶过滤层析

Fig. 5　Superdex G -200 gel chromatography for β -galactosidase

利用凝胶过滤层析测定酶的相对分子质量，将该酶在Superdex G-200 10/300 GL 凝胶柱中的洗脱体积12.460 5 mL 代入到凝胶过滤蛋白标准曲线 $\lg M_w=-2.991K_{av}+5.936$，$K_{av}=(V_e-V_o)/(V_t-V_o)$，得到该酶的相对分子质量为 114 500。

2.2.5　*β-半乳糖苷酶分离纯化各步骤的总结*　*B. licheniformis* SYBC hb15 产 β-半乳糖苷酶的各步的分离纯化的结果见表 3。

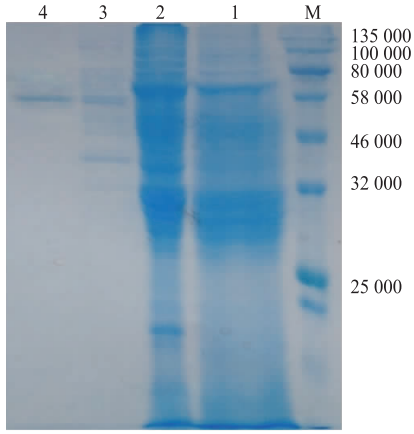
表 3　*B. licheniformis* SYBC hb15 产 β-半乳糖苷酶的分离纯化结果

Table 3　Purification of β-galactosidase from *B. licheniformis* SYBC hb15

提纯步骤	总活力/U	总蛋白质质量/mg	比活/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	802.2	256	3.13	1.00	100
$(NH_4)_2SO_4$ 分级沉淀	649.0	46.6	13.92	4.45	80.9
Q HP 离子交换	540.6	9.21	58.69	18.73	67.4
Sephadex G-200	252.5	2.08	121.4	38.65	31.48

由表 3 可知，粗酶经过硫酸铵分级沉淀、离子交换层析以及凝胶过滤层析等步骤分离纯化后，比酶活提高到 121.4 U/mg，纯化倍数达 38.65，回收率为 31.48%。

将纯化各步骤所得的组分进行变性蛋白质电泳 SDS-PAGE，结果见图 6。经凝胶过滤层析收集到的样品在电泳图中呈现一条带，达到电泳纯。电泳纯度的 β-半乳糖苷酶的迁移率 R_f 为 0.771 1，相对分子质量标准曲线 $\lg M_w=-0.994\ 3R_f+5.523\ 0$，求出该 β-半乳糖苷酶的相对分子质量为 57 000。结合凝胶过滤层析测定的相对分子质量约为 114 500，推断该 β-半乳糖苷酶为一个二聚体蛋白质。



泳道 1：粗酶液；泳道 2：硫酸铵沉淀；泳道 3：Q HP 纯化；泳道4：凝胶层析纯化

图 6　β-半乳糖苷酶的 SDS-PAGE

Fig. 6　SDS-PAGE for purified β-galactosidase

2.3 β-半乳糖苷酶的酶学性质

2.3.1 β-半乳糖苷酶的最适反应温度 由图 7 可知,*B. licheniformis* SYBC hb15 发酵产的 β-半乳糖苷酶随温度升高催化活性增强,当达到 60 ℃时,酶活力最高,是 30 ℃时酶活的 10 倍。温度继续升高,酶活开始下降。因此,此 β-半乳糖苷酶的最适反应温度为 60 ℃。

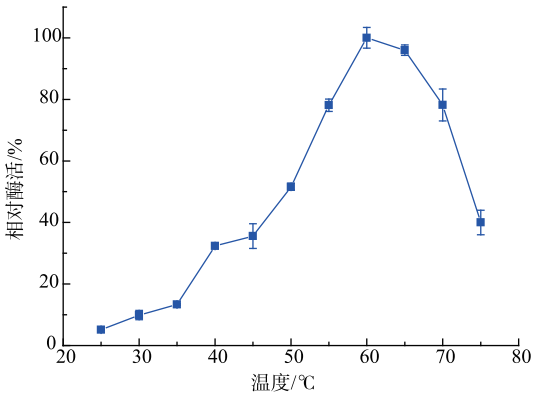


图 7 β-galactosidase 的最适反应温度

Fig. 7 Optimal reaction temperature of β-galactosidase

报道认为芽孢杆菌等细菌产生的 β-半乳糖苷酶最适催化温度一般为 50~70 ℃[9],如表 4 所示,部分芽孢杆菌属的菌株所产该酶的最适反应温度较高,同样嗜热菌及真菌中霉菌所产的该酶也有很高的最适反应温度。在高温下,有利于缩短水解反应时间和减少污染的风险[20]。

表 4 不同微生物来源的 β-半乳糖苷酶的最适反应温度

Table 4 β-galactosidases from different microbial sources and its optimal reaction temperature

来源	最适温度/℃	参考文献
Bacillus coagulans RCS3	65	[20]
Bacillus licheniformis DSM 13	50	[21]
Bacillus megaterium 2-37-4-1	55	[22]
Teratosphaeria acidotherma AIU BGA-1	70	[23]
Thermotogamaritima	75	[24]
Aspergillus carbonarius	50	[25]
Aspergillus niger van Tieg	65	[26]

2.3.2 β-半乳糖苷酶的热稳定性 由图 8 可知,β-半乳糖苷酶在 30~50 ℃水浴放置 0.5~2 h,酶活力下降在 10%以内。但在 60 ℃水浴放置 0.5 h 后下降了 25%,之后酶活力下降不显著;在 70 ℃以上,酶活力下降明显,80 ℃下水浴 0.5 h 后酶几乎完全丧失活性。相比之前报道的 *Bacillus licheniformis* DSM 13、*Bifidobacterium longum* 和 *Bacillus megaterium* 2-37-4-1 所产的酶有更高的热稳定性[21-22,27]。

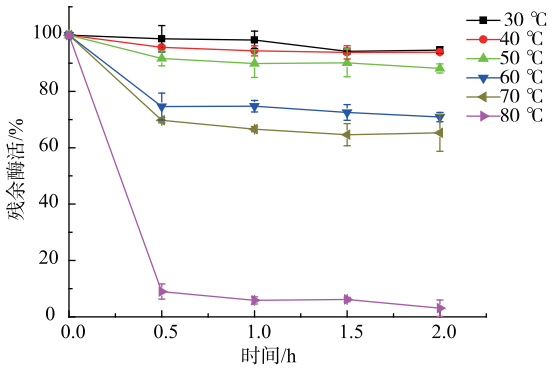


图 8 β-galactosidase 的温度稳定性

Fig. 8 Thermostability of β-galactosidase

β-半乳糖苷酶是一种蛋白质,它的活性主要由具有特殊空间结构的活性中心决定,故其酶活的稳定性与蛋白质三维空间结构相关。而加热会改变蛋白质空间结构而使蛋白质变性,造成 β-半乳糖苷酶失去活性。在食品实际发酵过程中一般要保持一定的温度以控制发酵周期与产品品质,因此要求所用的酶制剂必须具有较好热稳定性,从而 β-半乳糖苷酶能够更好的发挥作用[28]。从实验结果可知,*B. licheniformis* SYBC hb15 发酵产的 β-半乳糖苷酶具有较强的热稳定性,具有良好的应用前景。

2.3.3 β-半乳糖苷酶的最适反应 pH 由图 9 可知,*B. licheniformis* SYBC hb15 发酵产的 β-半乳糖苷酶在 pH 5.0~9.0 范围内活性较高, 但 pH 低于或高于 6.0 酶活力迅速下降,pH 6.0 时表现出最高的催化能力,因此 pH 6.0 是最适反应 pH,但当 pH 小于 5.0 或超过 9.0 时,酶基本失去了活力。一般认为细菌产的 β-半乳糖苷酶的最适 pH 介于 6.0~7.5。

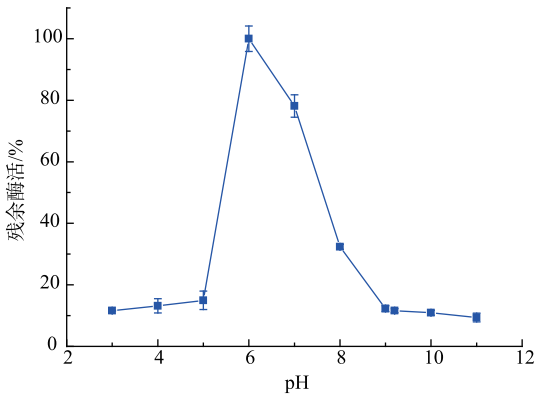


图 9 β-galactosidase 的最适反应 pH

Fig. 9 Optimal reaction pH value of β-galactosidase

2.3.4　β-半乳糖苷酶的 pH 稳定性　由图 10 可知，*B. licheniformis* SYBC hb15 发酵产 β-半乳糖苷酶在 pH 6.0~9.0 范围内，酶活力较稳定。而 Chunli Song 报道的 *Guehomyces pullulans* 17-1 所产 β-半乳糖苷酶在 pH 4.0~5.0 之间有较高的活性并保持相对稳定。pH 是 β-半乳糖苷酶最重要的环境因素之一，对酶活性产生较大影响。当 pH 过高或过低时会通过改变酶活性中心而影响酶活性。因此为了使酶发挥最佳催化效果，必须了解其最适 pH 及其稳定性，并在实际应用中合理控制催化环境。

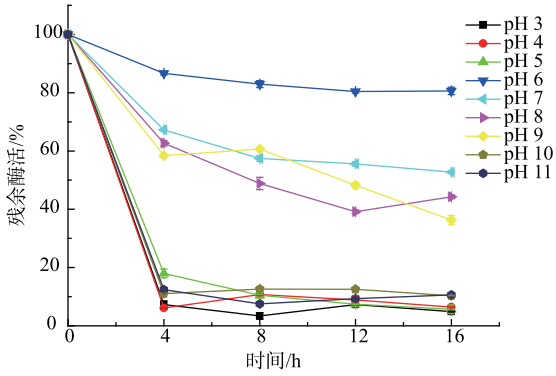


图 10　β-galactosidase 的 pH 稳定性

Fig. 10　pH stability of β-galactosidase

2.3.5　金属离子对 β-半乳糖苷酶酶活的影响　分别加入不同金属离子，测定其相对酶活力，见表 5。结果显示：金属离子中 K^+对 β-半乳糖苷酶酶活有明显的激活作用，可能 K^+会在 β-半乳糖苷酶中形成盐桥从而稳定酶的立体结构，在一定程度上提高了酶活性。而 Na^+对酶活力几乎无影响，Mg^{2+}、Ba^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}有一定抑制作用，Co^{2+}、Cu^{2+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}对酶活力有强烈抑制作用，特别是 Ca^{2+}、Mn^{2+}的抑制作用很强，可能它们破坏了酶活性中心，使蛋白质变性，酶活降低[28-29]。

表 5　金属离子对 β-galactosidase 活性的影响

Table 5　Effects of metal ions on β-galactosidase activity

金属离子	相对酶活/%
CK	100.00±2.121
Na^+	99.010±2.687
K^+	110.458±1.07
Co^{2+}	35.458±8.839
Cu^{2+}	35.396±1.414
Ca^{2+}	2.413±0.919
Mg^{2+}	87.438±0.071
Mn^{2+}	4.703±1.273
Zn^{2+}	83.106±1.202
Ba^{2+}	82.042±0.778
Ni^{2+}	60.891±4.808

2.3.6　单糖对 β-半乳糖苷酶酶活的影响　由图 11 可知，半乳糖和葡萄糖对 β-半乳糖苷酶的水解酶活有一定的影响。可以看出，葡萄糖对该酶的水解酶活具有较弱的抑制作用，相对水解酶活均大于 50%，而半乳糖对水解酶活具有较强的抑制作用，低浓度下就会使酶活降低到 10%。Yi-Ning Dong 报道半乳糖对 β-半乳糖苷酶水解 ONPG 抑制作用比葡萄糖的强[30]，也有报道的理论与此相反[31]，并且葡萄糖对水解酶活的抑制作用随浓度的增大越来越显著。

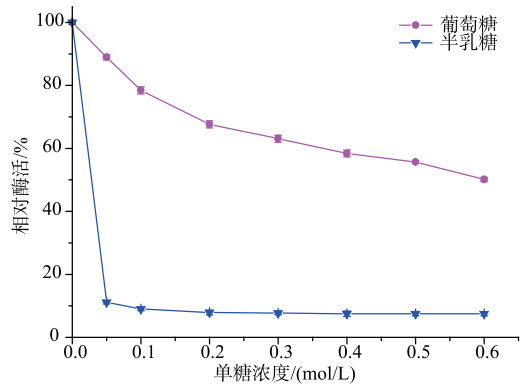


图 11　葡萄糖和半乳糖对 β-galactosidase 活性的影响

Fig. 11　Effects of glucose and galactose on β-galactosidase activity

葡萄糖浓度为 0.6 mol/L 时，本研究酶的相对酶活为 55.6%，与陈真真报道的同样葡萄糖浓度下宋氏志贺氏菌 *Shigellasonnei* SK22.001 所产的酶相对酶活 55%相当[16]，但蜜源菌株 *B. licheniformis* SYBC hb15 所产酶的安全性更好。*Lactobacillus reuteri* 在半乳糖浓度 200 mmol/L 时相对酶活为 45%，在葡萄糖浓度 170 mmol/L 时相对酶活为 95%[32]，而在葡萄糖浓度仅 10 mmol/L 时，所研究酶的相对酶活高于 *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58 所产酶的 58.3%[31] 和 *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 所产酶的 97.5%[27]。同时，低聚糖合成过程中，半乳糖被大量消耗，使半乳糖的含量远远小于葡萄糖的含量，会降低其对酶的抑制作用。

2.3.7　β-半乳糖苷酶的反应动力学常数　K_m 是酶的一个特征常数，K_m 的大小只与酶的性质有关，与酶浓度无关。K_m 近似表示酶与底物结合的亲和力大小，即 K_m 值愈小，则酶与底物的亲和力愈大；反之，则越小。

由图 12 的回归方程求得该酶对 ONPG 的特征常数 K_m 为 4.853 mmol/L，最大反应速率 V_{max} 为

14.705 μmol/(min·mg)。Onladda Juajun 等报道的此酶以 ONPG 为底物时 K_m 为 13.7 mmol/L [21]，另有 *Bacillus megaterium* 的 9.5 mmol/L[22]和 *Bacillus* No. C-125 的 9.26 mmol/L[33]，但 *Bacillus coagulans* 的仅为 4.2 mmol/L[20]。可见该酶对底物 ONPG 的亲和性较大。(y 代表 $1/V$，x 代表 $1/S$)

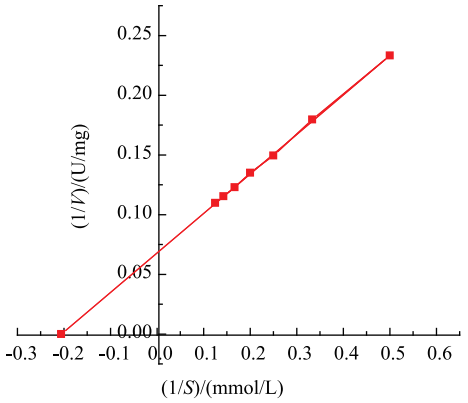


图 12　β-半乳糖苷酶对 ONPG 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 12　Lineweaver-Burk plot of β-galactosidase using ONPG as substrate

3 结　语

筛选到一株可产 β-半乳糖苷酶的蜜源芽孢杆菌，对其进行生理生化及 16S rRNA 鉴定确定为地衣芽孢杆菌，在此基础上分离纯化酶，进行酶学性质研究。结果表明：β-半乳糖苷酶的最适水解反应温度是 60 ℃；该酶具有较高的热稳定性；最适反应 pH 为 6，在 pH 6.0~9.0 范围内酶活稳定；K^+ 对此酶有明显激活作用；当葡萄糖浓度为 0.6 mol/L 时，酶活力仍然保持 50% 以上。因此，*B. licheniformis* SYBC hb15 所产 β-半乳糖苷酶属于一种耐热、耐葡萄糖的 β-半乳糖苷酶。

参考文献：

[1] TIAN Aimei, LIU Jinlong, CAO Jiashu. β-Galactosidase in plants[J]. **Chinese Journal of Cell Biology**, 2014, 36(5): 703-707. (in Chinese)

[2] LIU Fangning, LIANG Qi, ZHANG Yan, et al. Research advancement on β-galactosidase from microorganism[J]. **China Brewing**, 2012, 31(12): 5-9. (in Chinese)

[3] WEI L, YI S, HONG Y, et al. Synthesis of oligosaccharides with lactose and N-acetylglucosamine as substrates by using β-D-galactosidase from *Bacillus circulans*[J]. **Eur Food Res Technol**, 2010, 2(31): 55-63.

[4] LI Y, WANG H, LU L, et al. Purification and characterization of a novel β-galactosidase with transglycosylation activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2009, 158(1): 192-199.

[5] ZHANG Mingwen, GU Quliang, ZHANG Bo, et al. Advancement in lactase study[J]. **Journal of Microbiology**, 2011, 31(3): 81-86. (in Chinese)

[6] GAO Zhaojin, HOU Jinhui, SUN Huigang, et al. Purification and enzymatic characterization of thermostable β-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* XG24[J]. **Food Science**, 2010, 31(23): 151-156. (in Chinese)

[7] VERA C, GUERRERO C, ILLANES A. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations[J]. **Carbohydr Res**, 2011, 346(6): 745-752.

[8] NERI D F M, BALCAO V M, COSTA R S, et al. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β-galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol[J]. **Food Chem**, 2009, 115(1): 92-99.

[9] DONG Yining, CHEN Haiqin, LIU Xiaoming, et al. Research progress in thermostable β-galactosidases[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(1): 384-387. (in Chinese)

[10] FRENZEL M, ZERGE K, CLAWIN-RADECKER I, et al. Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β-galactosidases[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2015, 60(2): 1068-1071.

[11] GAO Xiurong,MA Li,YE Hua. Research advancement of β-galactosidase[J]. **Biotechnology Bulletin**,2005,3(5):18-20.(in Chinese)
[12] NATH A,SARKAR S,MAITRA M,et al. An experimental study on production of intracellular β-galactosidase at different conditions by batch process using isolated *Bacillus safensis* (JUCHE 1) and characterization of synthesized β-galactosidase[J]. **Journal of The Institution of Engineers(India):Series E**,2013,93(2):55-60.
[13] JUAJUN O,NGUYEN T H,MAISCHBERGER T,et al. Cloning,purification,and characterization of β-galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2011,89(3):645-654.
[14] ESAWY M A,AHMED E F,HELMY W A,et al. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans[J]. **Carbohydrate Polymers**,2011,86(2):823-830.
[15] FANG Jingjing,ZHANG Yanzhou,JIANG Wei,et al. Screening and identification of laccase-producing bacterial strain and preliminary optimization of fermentation conditions[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,6(35):660-666.(in Chinese)
[16] 陈真真. β- 半乳糖苷酶菌株筛选、酶的分离纯化和性质及酶法合成低聚半乳糖的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
[17] 剧淑君. β-D- 半乳糖苷酶的发酵生产、分离纯化和性质研究[D]. 无锡:江南大学,2011.
[18] OTIENO D O. Synthesis of β-galactooligosaccharides from lactose using microbial β-galactosidases[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**,2010,9(5):471-482.
[19] ZHANG Li,LI Qingzhang,TIAN Lei. Research advancement of β-galactosidase[J]. **Journal of Northeast Agricultural University**,2009,40(7):128-131.(in Chinese)
[20] BATRA N,SINGH J,JOSHI A,et al. Applications of β-gal-III isozyme from *Bacillus coagulans* RCS3,in lactose hydrolysis[J]. **Int J Biol Macromol**,2011,49(5):879-884.
[21] JUAJUN O,NGUYEN T-H,MAISCHBERGER T,et al. Cloning,purification,and characterization of β-galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2010,89(3):645-654.
[22] LI Y,WANG H,LU L,et al. Purification and characterization of a novel β-galactosidase with transglycosylation activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2008,158(1):192-199.
[23] ISOBE K,YAMASHITA M,CHIBA S,et al. Characterization of new β-galactosidase from acidophilic fungus,*Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1[J]. **J Biosci Bioeng**,2013,116(3):293-297.
[24] KATROLIA P,ZHANG M,YAN Q,et al. Characterisation of a thermostable family 42 β-galactosidase (BgalC) family from *Thermotoga maritima* showing efficient lactose hydrolysis[J]. **Food Chem**,2011,125(2):614-621.
[25] O'CONNELL S,WALSH G. Application relevant studies of fungal β-galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2008 14(9):129-138.
[26] O'CONNELL S,WALSH G. A novel acid-stable,acid-active β-galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2010,86(2):517-524.
[27] HSU C A,YU R C,CHOU C C. Purification and characterization of a sodium-stimulated β-galactosidase from *Bifidobacterium longum* CCRC 15708[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2005,22(4):355-361.
[28] GAO Ruichang,ZHAO Mengqin,SHI Tong,et al. Biochemical characteristics of an extracellular protease secreted by *Halobacteriaceae* sp.[J]. **Food and Fermentation Industries**,2016,42(11):65-70.(in Chinese)
[29] LI Li,WANG Ruiming,LI Piwu,et al. Enzymatic properties of a novel β-galactosidase from *Penicillium* sp.[J]. **China Food Additives**,2013,3:121-126.(in Chinese)
[30] DONG Y N,WANG L,GU Q,et al. Optimizing lactose hydrolysis by computer-guided modification of the catalytic site of a wild-type enzyme[J]. **Mol Divers**,2013,17(2):371-382.
[31] NGUYEN T H,SPLECHTNA B,STEINBOCK M,et al. Purification and characterization of two novel β-galactosidases from *Lactobacillusreuteri*[J]. **J Agric Food Chem**,2006,54:4989-4998.
[32] NAKKHARATA P,HALTRICH D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with glucosidase and galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58[J]. **Journal of Biotechnology**,2006,123:304-313.
[33] IKURA Y,HORIKOSHI K. β-Galactosidase in *Alkalophilic bacillus*[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**,2014,43(6):1359-1360.