米曲霉β-半乳糖苷酶的定向进化、高效表达及应用

李晨霞[1]，向芷璇[1]，李 敬[1]，江正强[*1]，闫巧娟[2]，马俊文[2]
（1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院，北京 100083；2. 中国农业大学 工学院，北京 100083）

摘要： 定向进化米曲霉β-半乳糖苷酶（AoBgal35A），以提高其水解乳糖的效率，通过易错PCR构建米曲霉β-半乳糖苷酶的突变体文库，高通量筛选水解乳糖效率高的突变体，将其在毕赤酵母中高效表达，并用于制备无乳糖牛奶。筛选得到一个正向突变体（mAoBgal35A），经高密度发酵酶活力达4 760 U/mL。纯化后，mAoBgal35A的最适pH和温度分别为5.0和55 ℃，比野生型AoBgal35A分别提高了0.5和降低了5 ℃。mAoBgal35A在室温下能高效水解牛奶中的乳糖，加酶量为2 U/mL时，水解72 h后牛奶中的乳糖质量浓度为0.38 g/dL，达到无乳糖牛奶标准。而野生型AoBgal35A的加酶量为20 U/mL时，在相同条件下水解后，乳糖质量浓度为0.6 g/dL。由此表明，定向进化明显提高了米曲霉β-半乳糖苷酶水解乳糖的效率，所得正向突变体在制备无乳糖乳品中具有很大的应用潜力。

关键词： 米曲霉；β-半乳糖苷酶；定向进化；高效表达；水解乳糖
中图分类号：Q 814　**文章编号：**1673-1689(2022)10-0049-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.004

Directed Evolution, High-Level Expression and Application of the β-Galactosidase from *Aspergillus oryzae*

LI Chenxia[1]，*XIANG Zhixuan*[1]，*LI Jing*[1]，*JIANG Zhengqiang*[*1]，*YAN Qiaojuan*[2]，*MA Junwen*[2]
（1. College of Food Science and Nutritional Engineering，China Agricultural University，Beijing 100083，China；
2. College of Engineering，China Agricultural University，Beijing 100083，China）

Abstract： The β-galactosidase (AoBgal35A) from *Aspergillus oryzae* was modified by directed evolution to improve its hydrolysis efficiency of lactose. A mutation library of AoBgal35A was constructed by error-prone PCR. The mutants with high hydrolysis efficiency of lactose were screened by high-throughput screening and efficiently expressed in *Pichia pastoris* to prepare lactose-free milk. A positive mutant (mAoBgal35A) was selected and its enzyme activity reached 4 760 U/mL after high cell density fermentation. Purified mAoBgal35A showed the highest activity at pH 5.0 and 55 ℃. The optimum pH and temperature of mAoBgal35A were increased by 0.5 and decreased by 5 ℃ compared with the wild-type AoBgal35A, respectively. The mAoBgal35A could effectively hydrolyze the lactose in milk in 72 h at room temperature with the enzyme dosage of 2 U/mL, and the content of lactose in milk was 0.38 g/dL, which was within the standard range of lactose-free milk. However, for the wild-type enzyme, the content of lactose in milk was 0.6 g/dL with the enzyme dosage of 20 U/mL under the same conditions. The results showed that directed

收稿日期： 2022-05-10
基金项目： 国家自然科学基金面上项目（32072163）。
* **通信作者：** 江正强（1971—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶工程研究。E-mail：Zhqjiang@cau.edu.cn

evolution significantly improved the hydrolysis efficiency of AoBgal35A, and the positive mutant mAoBgal35A showed great application potential in lactose-free milk.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, β-galactosidase, directed evolution, high-level expression, lactose hydrolysis

β-半乳糖苷酶（β-galactosidase，EC 3.2.1.23），又称乳糖酶，具有水解和转糖苷两种催化活性[1]，广泛存在于植物、动物和微生物中。微生物β-半乳糖苷酶具有发酵周期短、产酶量大、催化活性高和稳定性好等优点。目前，工业应用的β-半乳糖苷酶主要来源于曲霉属（*Aspergillus* sp.）和克鲁维酵母属（*Kluyveromyces* sp.），曲霉属β-半乳糖苷酶是胞外酶，最适 pH 在酸性范围内（pH 2.5~5.4），最适温度一般为 50~60 ℃[2]。米曲霉（*Aspergillus oryzae*）的基因组中包含有 6 个β-半乳糖苷酶基因，目前已报道的 3 个来源于米曲霉的β-半乳糖苷酶基因（*O58*、*AO*、*O76*）均属于 GH35 家族，可在毕赤酵母 GS115 表达[3]。其中，米曲霉β-半乳糖苷酶（AO）具有优良的水解和转糖苷活性，研究较多，尤其是在分子改造和固定化方面[4-7]。采用密码子优化和组成型启动子 PGAP 将该酶在毕赤酵母 SMD1168H 中高效表达[4]；通过组成型启动子 PGCW14 和源自酵母的自我复制序列（PARS）构建关于该酶的非甲醇诱导游离型表达载体[5]；经过定点突变，获得突变体（N140C/W806F）的转糖苷能力提高了 24.1%[6]；通过制备共聚物（Col-Al/Col-Al-Glu）将该酶进行固定化，实现该酶的重复利用[7]。米曲霉β-半乳糖苷酶能够水解牛奶中的乳糖，可有效改善乳糖不耐症，在乳制品行业中具有重要的应用价值，但水解效率和表达水平亟待提高。

通过分子改造提高β-半乳糖苷酶的水解效率，是提升其应用价值的有效方法之一。定向进化将乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）β-半乳糖苷酶水解乳糖的效率提高 2 倍[8]；凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）β-半乳糖苷酶第 148 位 Asn 突变为 Asp，降低水解产物半乳糖的抑制作用，提升水解效率，但突变体的酶活力仅为野生型的 13.5%[9]；嗜热脂肪芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）β-半乳糖苷酶第 351 位 Glu 突变为 Arg，提高了该酶对于乳糖的亲和力，突变体的最适 pH 提高了 0.5，比活力由 1.86 U/mg 提高到 6.56 U/mg[10]；极端嗜热古菌（*Pyrococcus furiosus*）β-半乳糖苷酶第 415 位 Asn 突变为 Ser，改变了活性中心疏水基团的结构，提高了该酶在巴氏灭菌温度下牛奶中乳糖的水解效率，但突变体的酶活力仅 120 U/mL[11]。这些研究通过定向进化及定点突变提高了水解效率，但β-半乳糖苷酶的表达水平较低。毕赤酵母具有胞外高效表达、发酵工艺成熟、成本低等特点，已用于表达多种β-半乳糖苷酶[12]，如亮白曲霉（*Aspergillus candidus*）β-半乳糖苷酶在毕赤酵母中表达的酶活力达 3 600 U/mL[13]。米曲霉β-半乳糖苷酶在毕赤酵母中表达的酶活力为 4 239 U/mL[4]。因此，同时提高米曲霉β-半乳糖苷酶的水解效率及表达水平，更有利于工业化应用。

米曲霉β-半乳糖苷酶（AoBgal35A）最适 pH 及温度分别为 pH 4.5 及 60 ℃[6]。作者利用定向进化技术对 AoBgal35A 进行分子改造，在毕赤酵母中高效表达水解率提高的突变体，进一步评价突变酶在制备无乳糖牛奶中的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

Fast *Pfu* DNA 聚合酶：北京全式金生物技术公司产品；rTaq DNA 聚合酶和 DNA Marker：Takara 公司产品；限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶：New England Biolabs 公司产品；真菌基因组 DNA 提取试剂盒：北京百泰克生物技术有限公司产品；Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒：AxyGen 公司产品；总 RNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司产品；Lowry 法蛋白质浓度试剂盒：北京索莱宝公司产品；MyCycler PCR 自动扩增仪：美国 BIO-RAD 公司产品；CBIO-GelPro 凝胶成像分析系统：北京赛百奥科技有限公司产品；FUG-5 L 单层玻璃机械搅拌发酵罐：上海国强生化工程装备有限公司产品；GL-20B 高速冷冻离心机：上海安亭科学仪器厂产品；蛋白质纯化系统：上海青浦沪西仪器厂产品；Q-Sepharose 强阴离子交换柱：美国

GE Healthcare 公司产品;TU-1800PC 紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器设备有限责任公司产品;Kieselgel 60 硅胶板:德国 Merck 公司产品;高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)系统:Agilent Technologies 公司产品;其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

1.2 菌株及培养基

米曲霉(中国普通微生物菌种保藏管理中心 NO.3.0411)菌株由作者所在实验室保藏[14];大肠杆菌 DH5α 感受态细胞和毕赤酵母 GS115:北京全式金生物有限公司产品;质粒 pPIC9K:美国 Invitrogen 公司产品。

MM(minimal methanol)培养基:YNB 13.4 g/L,生物素 4×10^{-4} g/L,甲醇 10 g/L,琼脂 15 g/L;其他培养基的配置与文献[12]相同。

1.3 实验方法

1.3.1 β-半乳糖苷酶随机突变体文库的构建 使用真菌基因组 DNA 提取试剂盒和总 RNA 提取试剂盒分别提取米曲霉基因组 DNA 和总 RNA,采用 PolyATract mRNA Isolation Systems(Promega)从米曲霉总 RNA 中纯化 mRNA,并合成 cDNA 第一链。根据 AoBgal35A 基因序列(GenBank 登录号为 KF857462),设计引物 AoBgal35AF:5′-ATGAAGCTCCTCTCTGTTGCT-3′和 AoBgal35AR:5′- TTAGTATGCTCCCTTCCGCT-3′,以米曲霉基因组 cDNA 为模板,扩增基因。PCR 反应体系:5×Fast *Pfu* Buffer 10 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,模板 1 μL,Fast *Pfu* DNA 聚合酶 1 μL,补 ddH_2O 至 50 μL。PCR 反应条件:95 ℃,3 min;95 ℃,20 s,55 ℃,20 s,72 ℃,3 min;反应循环 34 次;72 ℃,5 min。胶回收 PCR 产物作为易错 PCR 模板。设计特异性引物 Ao-F:5′-GTCATTAC GTAGCTTCCATCAAGCATCGTCTC-3′和 Ao-R:5′-CTCAGCCTAGGTTAGTATGCTCCCTTCCGCTG-3′,采用不同浓度的 Mg^{2+}和 Mn^{2+}对米曲霉 β-半乳糖苷酶基因(*AoBgal35A*)进行易错 PCR 扩增。易错 PCR 反应体系如下:0.1 mmol/L Mn^{2+}或 0.2 mmol/L Mn^{2+} 1 μL,5 mmol/L Mg^{2+}或 7 mmol/L Mg^{2+} 1 μL,0.2 mmol/L dGTP 和 dATP 各 1 μL,1.0 mmol/L dCTP 和 dTTP 各 1 μL,0.2 μmol/L Ao-F/R 各 1 μL,1.25 U rTaq DNA 聚合酶 1 μL,模板 1 μL,5×rTaq Buffer 10 μL,用纯水补足至 50 μL。易错 PCR 反应条件:95 ℃,3 min;95 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,3 min;反应循环 34 次;72 ℃,10 min。

易错 PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳验证后进行胶回收,用限制性内切酶 *SnaB* Ⅰ和 *Avr* Ⅱ分别酶切胶回收产物和载体 pPIC9k。用 T4 DNA 连接酶于 16 ℃连接过夜,连接产物热激转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(100 μg/mL)的 LB 平板,37 ℃倒置培养 12~16 h,即为随机突变体文库。经菌落 PCR 验证,选取 10 个阳性转化子测序。收集随机突变体文库所有转化子接入 LB 培养基中,于 37 ℃摇床培养 4~5 h,提取质粒经限制性内切酶 *Pme* Ⅰ线性化,通过乙醇沉淀回收,电击转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞,转化步骤参考毕赤酵母发酵手册(Version B,053002,Invitrogen)操作。转化产物均匀涂布于 MD 平板,于 30 ℃培养箱静置培养 72 h。

1.3.2 β-半乳糖苷酶随机突变体文库的筛选 利用 X-gal 固体培养基进行初筛,牙签挑取 MD 平板上的单克隆,点到涂有 20 mg/mL X-gal 溶液的 MM 平板上,30 ℃培养 48 h。产 β-半乳糖苷酶的菌株经甲醇诱导产酶后,可水解 X-gal,从而形成深蓝色菌落。挑取初筛具有 β-半乳糖苷酶酶活力的菌株,接种于 BMGY 培养基,30 ℃、200 r/min 培养 24 h 后转接于 BMMY 培养基中,在 30 ℃、200 r/min 培养 72 h,每隔 24 h 补加 0.5%(体积分数)的甲醇诱导产酶。发酵液经离心,收集上清液即为粗酶液。粗酶液进行水解活性复筛,以 5 g/dL 乳糖为底物,加酶量 5 U/mL,在 pH 4.5、50 ℃条件下反应 4 h 后,将样品煮沸 5 min 灭酶。采用薄层层析法(thin layer chromatography,TLC)定性分析水解产物,样品于 TLC 分析板上展层 2 次,展层剂为正丁醇、乙醇、水(体积比为 5:3:2),用显色剂完全浸湿吹干后在 180 ℃显色,显色剂为浓硫酸和甲醇(体积比为 5:95),标准品为葡萄糖、半乳糖和乳糖。乳糖水解率提高的突变体为正向突变体。将筛选到的正向突变体 mAoBgal35A 进行基因测序,与野生型 AoBgal35A 的基因进行序列比对分析,确定 mAoBgal35A 的突变位点。

1.3.3 β-半乳糖苷酶突变体(mAoBgal35A)的高密度发酵及纯化 选取正向突变体 mAoBgal35A 转化毕赤酵母 GS115,进行高拷贝筛选。用无菌水将 MD 平板上的 His^+转化子重悬,菌液适当稀释后,分别涂

布于不同浓度 G418-YPD 平板上，30 ℃倒置培养 2~5 d。挑取不同转化子，摇瓶发酵 3 d，测定上清液的酶活力。选择酶活力最高的菌株进行高密度发酵，采用 5 L 发酵罐进行发酵，发酵方法及相关培养基配制参照毕赤酵母发酵手册(Version B，053002，Invitrogen)操作。发酵液于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，收集上清液即为粗酶液，粗酶液在缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠盐，pH 7.0)中透析过夜。利用 Q-Sepharose 强阴离子交换柱纯化重组蛋白质，以 0.4 mL/min 流量上样。交换柱预先用 10 个柱体积的缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠盐，pH 7.0)平衡，经含 0~500 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L(pH 7.0)磷酸钠盐缓冲液线性洗脱，收集具有酶活力的组分，采用 SDS-PAGE 分析蛋白质纯度，纯化后的蛋白质于 pH 5.0 柠檬酸缓冲液中透析。

1.3.4 *β-半乳糖苷酶的酶活力及蛋白质质量浓度的测定* β-半乳糖苷酶酶活力的测定参照文献[15]的方法。在 1.5 mL 的离心管中加入 75 μL 15 mmol/L 的 *o*NPG 和 150 μL 50 mmol/L 的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液 (pH 5.0)，55 ℃预热 3 min 后加入 25 μL 适当稀释的酶液，55 ℃反应 10 min 后加入 750 μL 的 2 mol/L Na_2CO_3 终止反应，在 410 nm 下测定释放的邻硝基苯酚(*o*NP)的量。酶活力单位定义：在上述反应条件下，每分钟催化 *o*NPG 水解释放 1 μmol 邻硝基苯酚所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。参照 Lowry 法[16]测定蛋白质的质量浓度，以牛血清蛋白(bovine serum albumin，BSA)作为标准蛋白质。

1.3.5 *β-半乳糖苷酶的酶学性质测定* 最适 pH 测定：采用 50 mmol/L 不同 pH 的缓冲溶液(柠檬酸-柠檬酸三钠，pH 3.0~6.0；磷酸氢二钠-磷酸二氢钠，pH 6.0~7.0；Tricine，pH 7.5~8.0)，按照标准方法测定不同 pH 下的酶活力，以酶活力最高点为 100%，分别计算不同 pH 下的相对酶活力。

pH 稳定性测定：参照文献[17]的方法，用上述不同 pH 的缓冲液稀释酶液至约 1 mg/mL 于 50 ℃保温 30 min，然后迅速将样品置于冰水浴中冷却 30 min，按照标准方法测定其残余酶活力，以未经处理的纯酶液酶活力为 100%计算相对酶活力。

最适温度测定：分别在不同温度条件下(30~75 ℃)的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液(pH 5.0)中测定酶反应最适温度。以酶活力最高点为 100%，分别计算不同温度下的相对酶活力。

温度稳定性测定：参照文献[17]的方法，酶液用柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液 (pH 5.0) 稀释至约 1 mg/mL 后，置于不同温度(30~75 ℃)下保温 30 min，然后迅速将样品置于冰水浴中冷却 30 min，测定其残余酶活力，以未经处理的纯酶液酶活力为 100%计算相对酶活力。

动力学参数测定：以 50 mmol/L 最适 pH 缓冲液配制 1.5~5.0 mmol/L 的 *o*NPG 为底物，按照标准方法于最适温度下反应 5 min 后测定其比活力。通过 GraphPad Prism 6 软件，根据 Michaelis-Menten 进行非线性拟合计算突变酶的动力学参数。

1.3.6 *β-半乳糖苷酶突变体 mAoBgal35A 的水解特性及制备无乳糖牛奶* 水解特性：利用柠檬酸-柠檬酸三钠 (pH 5.0) 缓冲液配置的 5 g/dL 乳糖为底物，在 55 ℃和加酶量 5 U/mL 的条件下水浴保温，分别在 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 取样，样品煮沸 5 min 灭酶。TLC 检测方法如 1.3.2 所示。HPLC 检测方法：以葡萄糖、半乳糖、乳糖的混合溶液(终质量浓度为 1 mg/mL)作为标准品，色谱柱为 BP-800Pb++，检测器为示差折光检测器(RAD)，流动相为纯水，进样体积为 10 μL，流量为 0.6 mL/min，柱温为 80 ℃。水解率的计算公式为：

$$H=\frac{A_1-A_2}{A_1}\times 100\%$$

式中：H 为水解率，%；A_1 为初始乳糖质量浓度，g/dL；A_2 为取样时乳糖质量浓度，g/dL。

制备无乳糖牛奶：在鲜牛乳中添加 β-半乳糖苷酶 mAoBgal35A，在室温下优化加酶量(1、2、3、4、5 U/mL)，定时取样后样品煮沸 5 min 灭酶，以乳糖质量浓度及水解率为指标，通过 HPLC 进行定量分析。

1.3.7 *数据处理与分析* 采用 Origin 9.0 进行数据统计分析和绘图。

2 结果与分析

2.1 米曲霉 β-半乳糖苷酶(AoBgal35A)随机突变体文库的筛选

调整易错 PCR 体系中 Mg^{2+}和 Mn^{2+}的浓度使碱基随机错配，从而构建随机突变体文库[18]。当 Mg^{2+}为 5 mmol/L、Mn^{2+}为 0.1 mmol/L 时，随机突变体文库的氨基酸突变率为 0.26%，处于合理突变范围内[19]。平板初筛 10 000 个突变体，300 个突变体具有 β-半乳糖苷酶活性，TLC 分析水解产物，153 个突变体具有

水解活性。复筛到一个水解率明显提升的正向突变体,命名为 mAoBgal35A,经序列比对,突变第 955 位的苏氨酸 Thr 突变为丙氨酸 Ala。

2.2 突变体 mAoBgal35A 的高密度发酵及纯化

突变体经 G418-YPD 平板筛选,摇瓶发酵酶活力最高为 48 U/mL。经 5 L 发酵罐高密度发酵,甲醇诱导 168 h 后,发酵液中 β-半乳糖苷酶的平均酶活力和蛋白质质量浓度分别为 4 760 U/mL 和 22 mg/mL,菌体质量浓度为 390 g/L(见图 1(a))。SDS-PAGE 结果表明(见图 1(b)),随着发酵时间的延长,相对分子质量为 110 000 处的蛋白质条带逐渐变粗,与野生型 AoBgal35A 的相对分子质量一致[4],发酵上清液中 β-半乳糖苷酶的含量逐渐增多。经 Q-Sepharose 强阴离子交换柱纯化得到电泳级纯酶(见图 1(c)),比活力由 216 U/mg 提高到 250 U/mg,纯化倍数 1.2,回收率 57.3%。

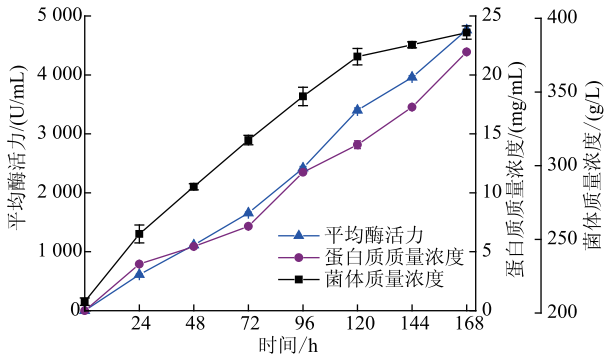
2.3 突变体 mAoBgal35A 的酶学性质

mAoBgal35A 的最适 pH 为 5.0,比野生型(pH 4.5)提高 0.5(见图 2(a)),在 pH 4.0~7.0 保持 80% 以上的酶活力,比野生型(pH 4.5~5.5)在更广泛的范围内保持稳定(见图 2(b))。mAoBgal35A 的最适温度为 55 ℃,比野生型(60 ℃)降低 5 ℃(见图 2(c)),mAoBgal35A 在 60 ℃以下保持 80%以上的酶活力,较野生型(≤55 ℃)稳定性稍有提高(见图 2(d))。mAoBgal35A 对 *o*NPG 的 K_m 为 (2.89±0.18) mmol/L,低于野生型((4.51±0.30) mmol/L),表明突变体对底物具有更高的亲和力。同时,mAoBgal35A 对 *o*NPG 的催化效率(k_{cat}/K_m)为 246.98 mmol/(L·s),是野生型 (191.61 mmol/(L·s)) 的 1.3 倍,表明 mAoBgal35A 具有更高的催化效率。

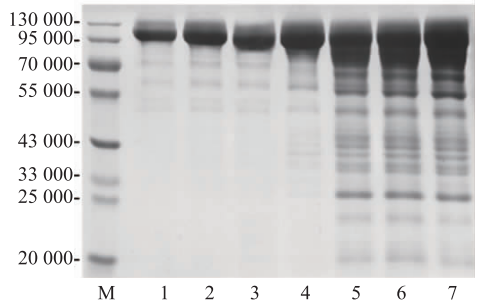
2.4 突变体 mAoBgal35A 水解特性及制备无乳糖牛奶

mAoBgal35A 水解乳糖的结果如图 3 所示,以 5 g/dL 乳糖为底物,在 pH 5.0 和 55 ℃的条件下反应 4 h,水解率由 84.2%提高到 95.2%。

mAoBgal35A 水解牛奶中乳糖的结果如图 4 所示,主要考察在室温条件下突变体 mAoBgal35A 水解牛奶中的乳糖的应用。通过加酶量优化,发现随着加酶量的增加,水解相同含量的乳糖所需的时间逐渐缩短,当加酶量为 2 U/mL 时,水解 72 h,牛奶中的乳糖基本被完全水解,乳糖水解率为 90.0%,牛奶中乳糖质量浓度为 0.38 g/dL,根据我国《食品营养标签管理规范》中有关《食品营养声称和营养成分功能声称准则(卫监督发[2007]300 号)》,达到了无乳糖牛奶标准(乳糖质量浓度≤0.5 g/dL)。牛奶色泽乳白,奶香浓郁,无不良风味。

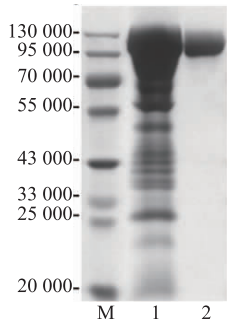


(a) 高密度发酵产mAoBgal35A历程



M:高相对分子质量标准蛋白质;泳道1~7:甲醇诱导 24~168 h 发酵液。

(b) SDS-PAGE分析

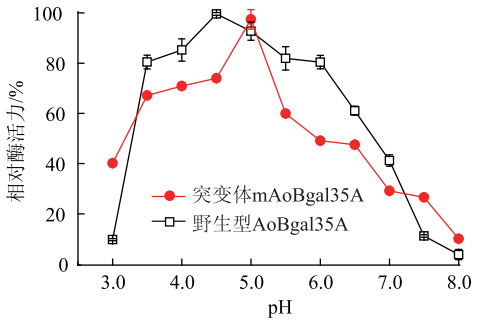


M:高相对分子质量标准蛋白质;1:粗酶液;2:经Q-Sepharose强阴离子交换柱纯化蛋白质。

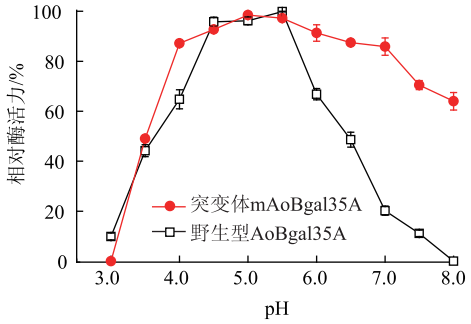
(c) 纯化结果

图 1 毕赤酵母高密度发酵产 mAoBgal35A 历程、SDS-PAGE 分析及纯化

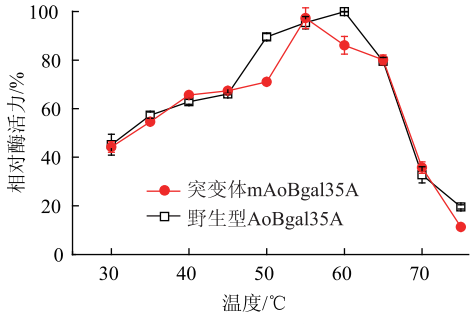
Fig. 1 Time-course of mAoBgal35A produced by Pichia pastoris, SDS-PAGE and purification of the extracellular fermentation



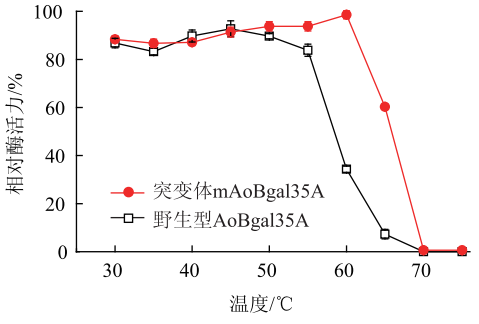
(a) 最适pH



(b) pH稳定性



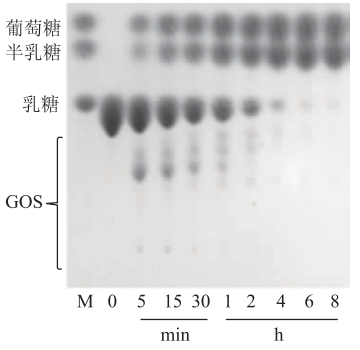
(c) 最适温度



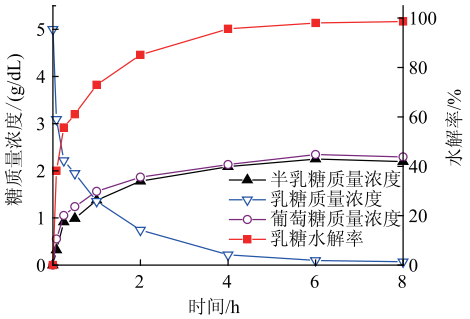
(d) 温度稳定性

图 2　AoBgal35A 和突变体 mAoBgal35A 的最适 pH、pH 稳定性、最适温度及温度稳定性

Fig. 2　Optimal pH, pH stability, optimal temperature and thermostability of AoBgal35A and mAoBgal35A



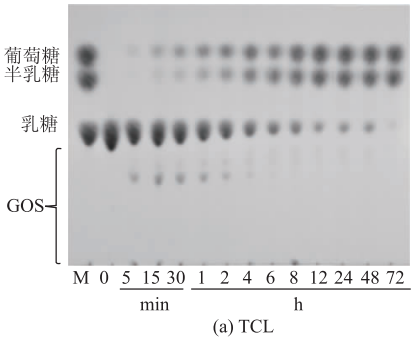
(a) TCL



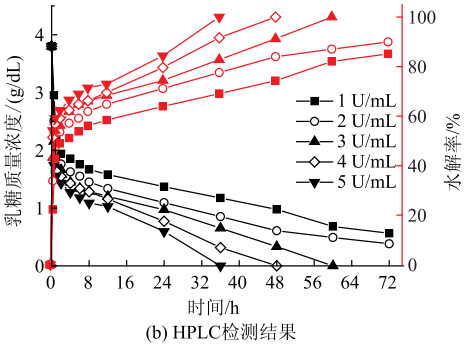
(b) HPLC检测结果

图 3　mAoBgal35A 水解乳糖的 TLC 和 HPLC 检测结果

Fig. 3　TLC and HPLC of hydrolysis lactose in milk by mAoBgal35A



(a) TCL



(b) HPLC检测结果

图 4　mAoBgal35A 水解牛奶中乳糖的 TLC 和室温下加酶量优化的 HPLC 检测结果

Fig. 4　TLC and HPLC of hydrolysis lactose in milk with different enzyme dosage at room temperature by mAoBgal35A

3 讨 论

目前提高β-半乳糖苷酶水解能力主要采用定向进化和定点突变的方法[8-11]。作者通过易错 PCR 对米曲霉β-半乳糖苷酶 AoBgal35A 进行定向进化，获得一个乳糖水解率明显提高的突变体 mAoBgal35A。突变体在毕赤酵母 GS115 中异源表达，经高密度发酵，胞外酶活力为 4 760 U/mL，高于米曲霉β-半乳糖苷酶在毕赤酵母 KM71（4 239 U/mL）[4]、毕赤酵母 GS115（1 434 U/mL）[20]和黑曲霉（2 640 U/mL）[21] 中的表达水平。同时，产酶（mAoBgal35A）水平也高于大多数β-半乳糖苷酶在毕赤酵母的表达水平，如来源于亮白曲霉（*Aspergillus candidus*，3 600 U/mL）[13]、节杆菌（*Arthrobacter* sp.，1 926 U/mL）[22] 及泡盛曲霉（*Aspergillus awamori*，347.8 U/mL）[23]等的β-半乳糖苷酶。mAoBgal35A 的高效表达使其在工业生产中具有较好的应用潜力。

mAoBgal35A 的最适 pH 及温度分别为 5.0 和 55 ℃，比野生型AoBgal35A（pH 4.5 和 60 ℃）分别提高了 0.5 和降低了 5 ℃。mAoBgal35A 的最适催化条件与大多数霉菌来源的β-半乳糖苷酶相似，如铜绿拟青霉（*Paecilomyces aerugineus*，pH 4.5 和 60 ℃）[24]、黑曲霉（*Aspergillus niger*，pH 3.5~4.5 和 50~60 ℃）[25]和构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*，pH 5.0 和 60 ℃）[26]等，但高于乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*，pH 4.4 和 37 ℃）[27] 来源的β-半乳糖苷酶。mAoBgal35A 的 pH 稳定性比野生型 AoBgal35A（pH 4.5~5.5）有所提高，在 pH 4.0~7.0 保持稳定，与泡盛曲霉（*Aspergillus awamori*，pH 4.7~7.5）[23]来源的β-半乳糖苷酶相近，优于黑曲霉（*Aspergillus niger*，pH 3.5~5.5）[25] 和土曲霉（*Aspergillus terreus*，pH 4.5~6.5）[28]来源的β-半乳糖苷酶。

序列分析表明，AoBgal35A 与米曲霉来源β-半乳糖苷酶（AobGal，PDB：4IUG）有 99%的同源性。AobGal 的三维结构由 6 个结构域组成，一个中心催化域被 5 个反平行的β-三明治结构域包围，排列成马蹄形或字母 C 形[29]。突变体分析如图 5 所示，mAoBgal35A 中突变的氨基酸 Thr955 位于第五结构域的β-片层结构，与其周围的 Asp897 和 Asn951 形成氢键相互作用。苏氨酸突变为丙氨酸减少了一个 Thr955 和 Asp897 之间的氢键，可能使其最适温度有所降低。苏氨酸突变为丙氨酸，替换了苏氨酸的长侧链，疏水残基 Ala 取代了亲水残基 Thr，可能会影响蛋白质亲疏水平衡，从而对蛋白质的稳定性有一定的影响。如扩展青霉脂肪酶突变体 K202A 与随机突变体（ep8）叠加突变使其热稳定性有一定的提高[30]。同时，极性残基 Thr 突变为非极性残基 Ala，使该部分区域极性下降，可能是最适 pH 变化的原因之一[31]。Thr955 位于酶分子表面，远离催化口袋，与底物没有直接的相互作用。Thr955 突变为丙氨酸增强了蛋白质的疏水性，这可能有助于在水溶液条件下形成更紧密的酶-底物复合物，从而提高水解活性[32]。如位于蛋白质结构表面的突变体 V88A 和 S157P、K207G 和 D37V 由于增加了蛋白质的疏水性而提高了酶活性[33]。

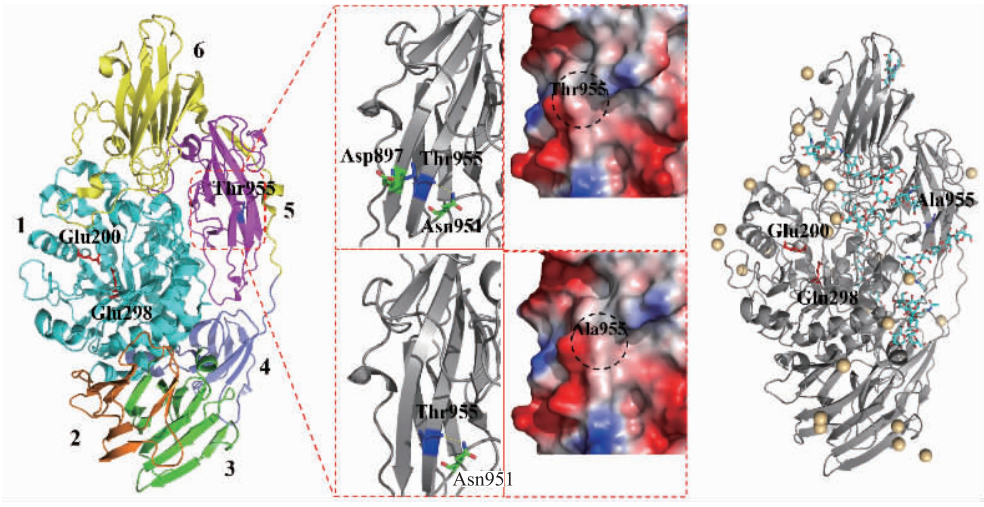


图 5　AoBgal35A 和 mAoBgal35A 的结构、改变位点、作用力及表面电荷分布示意图

Fig. 5　Structure，mutant sites，molecular force changes and surface charge distribution of AoBgal35Aand mAoBgal35A

牛奶的 pH 为 6.5~6.8，突变体 mAoBgal35A 在 pH 7.0 仍能保持 80%以上的酶活力，适合水解牛奶中的乳糖。mAoBgal35A 在室温及加酶量为 2 U/mL 水解 72 h 时，牛奶中乳糖质量浓度为 0.38 g/dL，达到无乳糖牛奶标准。而野生型AoBgal35A 在加酶量为 20 U/mL 时，室温水解 72 h，牛奶中乳糖质量浓度为 0.6 g/dL[4]。可见，mAoBgal35A 的加酶量仅需野生型的 10%，即可达到更好的水解效果。欧文氏菌（*Erwinia* sp. E602）来源的β-半乳糖苷酶在加酶量为 3 U/mL 时，12 h 水解牛奶中 60%的乳糖[34]。嗜冷杆菌（*Cryobacterium* sp. LW097）来源的β-半乳糖苷酶 Bgal322 在加酶量为 5 U/mL 时，24 h 仅水解牛奶中 8.4%的乳糖[35]。因此，mAoBgal35A 优良的水解特性使其在制备无乳糖牛奶方面具有很好的工业化应用价值。

4 结 语

对米曲霉β-半乳糖苷酶（AoBgal35A）基因进行定向进化，筛选到正向突变体 mAoBgal35A，在毕赤酵母中高效表达，酶活力达 4 760 U/mL，为目前米曲霉β-半乳糖苷酶在毕赤酵母中表达的最高水平。相比于野生型 AoBgal35A，mAoBgal35A 的最适温度降低至 55 ℃，最适 pH 提升至 5.0，在 pH 4.0~7.0 和 60 ℃以下保持稳定。mAoBgal35A 室温下高效水解牛奶中的乳糖，在制备无乳糖牛奶方面具有潜在的工业化应用价值。

参考文献：

[1] PETAR K, DIANAR M, SILVETTE R, et al. Screening and characterization of β-galactosidase activity in lactic acid bacteria for the valorization of acid whey[J]. **JDS Communications**, 2022, 3(1): 1-6.
[2] 董艺凝，陈海琴，张灏，等. β-半乳糖苷酶的研究现状与进展[J].食品与生物技术学报，2018，37(4)：337-343.
[3] 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)：172-182.
[4] ZHAO Q Q, LIU F, HOU Z W, et al. High level production of β-galactosidase exhibiting excellent milk-lactose degradation ability from *Aspergillus oryzae* by codon and fermentation optimization [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014, 172: 2787-2799.
[5] 胡梦凯，夏伟，吴敬，等. 通过非甲醇诱导游离型表达载体改善毕赤酵母中β-半乳糖苷酶表达[J]. 基因组学与应用生物学，2021，40(3)：1101-1109.
[6] 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.
[7] GENNARI A, MOBAYED F, VOLPATO G, et al. Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase: a potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch process[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 109: 303-310.
[8] RENTSCHLER E, SCHWARZ T, STRESSLER T, et al. Development and validation of a screening system for a β-galactosidase with increased specific activity produced by directed evolution[J]. **European Food Research and Technology**, 2016, 242: 2129-2138.
[9] LIU P, WU J W, LIU J H, et al. Engineering of a β-galactosidase from *Bacillus coagulans* to relieve product inhibition and improve hydrolysis performance[J]. **Journal of Dairy Science**, 2021, 104: 10566-10575.
[10] DONG Y N, LIU X M, CHEN H Q, et al. Enhancement of the hydrolysis activity of β-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* by saturation mutagenesis[J]. **Journal of Dairy Science**, 2011, 94 : 1176-1184.
[11] 尹蕾，王原媛，辛志豪，等. 耐热β-半乳糖苷酶（*Pyrococcus furiosus* DSM 3638）活性位点 N415S 点突变对其酶活性的影响[J]. 山东大学学报（理学版），2016，51(11)：74-87.
[12] 刘学强，江正强，余静，等. 海栖热袍菌木聚糖酶 B 的分子改造、高效表达及其在啤酒中的应用[J]. 食品科学，2021，43(6)：66-73.
[13] 张伟，范云六，姚斌. 亮白曲霉乳糖酶基因在毕赤酵母中的高效分泌表达及酶学性质研究[J]. 微生物学报，2005，45(2)：247-252.
[14] 杨绍青，江正强，王灵，等. 一种米曲霉磷脂酶 C 及其编码基因与应用：CN112522233A[P]. 2021-03-19.

[15] KATROLIA P,ZHANG M,YAN Q J,et al. Characterisation of a thermostable family 42 β-galactosidase (BgalC) family from *Thermotoga maritima* showing efficient lactose hydrolysis[J]. **Food Chemistry**,2011,125:614-621.
[16] LOWRY O H,ROSEBROUGH N J,FARR A L. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1951,193(1):265-275.
[17] LI L T,ZHANG M,JIANG Z Q,et al. Characterisation of a thermostable family 42 β-galactosidase from *Thermotoga maritima*[J]. **Food Chemistry**,2009,112:844-850.
[18] 史然,张登娅,谷懿寰,等. 地杆菌 α-*L*- 岩藻糖苷酶的分子改造及其在合成 2'- 岩藻糖基乳糖中的应用[J]. 食品科学,2021,42(18):135-142.
[19] 李树,张伟,赵春梅. 易错 PCR 技术定向进化褐藻胶裂解酶 Alg-2 的分析[J]. 食品科学,2019,40(4):146-151.
[20] SUN H B,BANKEFA O E,IJEOMA I O,et al. Systematic assessment of *Pichia pastoris* system for optimized β-galactosidase production[J]. **Synthetic and Systems Biotechnology**,2017,2:113-120.
[21] 徐晓东,陆娜,吴佳鹏,等. 一株高产酸性乳糖酶的黑曲霉菌株:CN113493799A[P]. 2021-10-12.
[22] HILDEBRANDT P,WANARSKA M,JOZEF K. A new cold-adapted β-*D*-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c-gene cloning,overexpression,purification and properties[J]. **BMC Microbiology**,2009,9(1):151-160.
[23] VIDYA C H,GNANESH K,CHINMAYEE C V,et al. Purification,characterization and specificity of a new GH family 35 galactosidase from *Aspergillus awamori*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,156:885-895.
[24] KATROLIA P,YAN Q J,JIA H Y,et al. Molecular cloning and high-level expression of a β-galactosidase gene from *Paecilomyces aerugineus* in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**,2011,69:112-119.
[25] NIU D D,TIAN X J,MCHUNU N P,et al. Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β-galactosidases [J]. **Electronic Journal of Biotechnology**,2017,27:37-43.
[26] KAMRAN A,BIBI Z,AMAN A,et al. Purification and catalytic behavior optimization of lactose degrading β-galactosidase from *Aspergillus nidulans*[J]. **Journal of Food Science and Technology**,2019,56(1):167-176.
[27] ALBUQUERQUE T L,SOUSA M,SILVA N C,et al. β-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*:characterization,production,immobilization and applications [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2021,191:881-898.
[28] VIDYA B,PALANISWAMY M,ANGAYARKANNI J,et al. Purification and characterization of β-galactosidase from newly isolated *Aspergillus terreus* (KUBCF1306) and evaluating its efficacy on breast cancer cell line (MCF-7) [J]. **Bioorganic Chemistry**,2020,94:1-9.
[29] MAKSIMAINEN M M,LAMPIO A,MERTANEN M,et al. The crystal structure of acidic β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2013,60:109-115.
[30] 邹有土,吴义真,施文芳,等. K202A 突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的影响[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(12):52-56.
[31] YOU X,QIN Z,LI Y X,et al. Structural and biochemical insights into the substrate-binding mechanism of a novel glycoside hydrolase family 134 β-mannanase[J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA) – General Subjects**,2018,1862(6):1376-1388.
[32] BASIT A,TAJWAR R,SADAF S,et al. Improvement in activity of cellulase Cel12A of *Thermotoga neapolitana* by error prone PCR[J]. **Journal of Biotechnology**,2019,306:118-124.
[33] ZHANG J,SHI H,XU L,et al. Site-directed mutagenesis of a hyperthermophilic endoglucanase Cel12B from *Thermotoga maritima* based on rational design[J]. **PLoS One**,2015,10(7):1-14.
[34] XIA Y,HE L L,MAO J J,et al. Purification,characterization,and gene cloning of a new cold-adapted β-galactosidase from *Erwinia* sp. E602 isolated in northeast China[J]. **Journal of Dairy Science**,2018,101:6946-6954.
[35] WANG L J,MOU Y Z,GUAN B,et al. Genome sequence of the psychrophilic *Cryobacterium* sp. LW097 and characterization of its four novel cold-adapted β-galactosidases[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,163:2068-2083.