

研究报告

鉴定隶属于糖苷水解酶 13 家族(glycoside hydrolase family 13, GH13)的潮滩发光杆菌的 β -半乳糖苷酶

于雅琪, 储名阅, 张振彪, 郑嘉妮, 阚乃猛, 彭惠*

安徽大学生命科学学院 现代生物制造安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230039

于雅琪, 储名阅, 张振彪, 郑嘉妮, 阚乃猛, 彭惠. 鉴定隶属于糖苷水解酶 13 家族(glycoside hydrolase family 13, GH13)的潮滩发光杆菌的 β -半乳糖苷酶[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3392-3403.

YU Yaqi, CHU Mingyue, ZHANG Zhenbiao, ZHENG Jiani, KAN Naimeng, PENG Hui. Identification of a novel GH13 β -galactosidase from *Photobacterium gaetbulicola*[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3392-3403.

摘要:【背景】糖苷水解酶 13 家族(glycoside hydrolase family 13, GH13)是已知最大的 α -淀粉酶家族, 不含有半乳糖苷酶。【目的】对海洋细菌潮滩发光杆菌(*Photobacterium gaetbulicola*)的一个蛋白 BgalPg 进行鉴定。【方法】通过保守位点分析和系统发育树确定 BgalPg 蛋白的家族分类; 通过克隆、表达和纯化测定重组 BgalPg 蛋白的酶学性质并鉴定功能。【结果】BgalPg 的蛋白序列新颖, 与已知的碳水化合物酶无同源性。序列分析结果表明该蛋白具有 GH13 家族的典型特性, 并且隶属于 GH13_38 亚家族。BgalPg 对 α -淀粉酶家族酶的相关底物均无催化活性, 却能水解含有 β -半乳糖苷键的底物 *p*NP- β -Gal [(2.8±0.4) U/mg]和 *o*NP- β -Gal [(1.4±0.3) U/mg], 并且能水解乳糖[(0.40±0.01) U/mg], 表现出典型的 β -半乳糖苷酶活性。同时, 该酶在 pH 7.0–8.5 稳定性好, 60 °C 的半衰期为 1.5 h。【结论】发现隶属于 GH13 家族的 β -半乳糖苷酶。

关键词: 糖苷水解酶 13 家族; GH13_38 亚家族; β -半乳糖苷酶; 温度稳定性

Identification of a novel GH13 β -galactosidase from *Photobacterium gaetbulicola*

YU Yaqi, CHU Mingyue, ZHANG Zhenbiao, ZHENG Jiani, KAN Naimeng, PENG Hui*

Anhui Provincial Key Laboratory of Modern Biomanufacturing, School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China

Abstract: [Background] Glycoside hydrolase family 13 (GH13), known as the largest α -amylase

资助项目: 国家自然科学基金(32170137)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170137).

*Corresponding author. E-mail: pph0259@126.com

Received: 2022-10-18; Accepted: 2022-12-26; Published online: 2023-03-06

family, does not contain galactosidases. **[Objective]** To identify a protein BgalPg from the marine bacterium *Photobacterium gaetbulicola*. **[Methods]** The family of BgalPg was identified by conserved motif analysis and a phylogenetic analysis. The *BgalPg* gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The enzymatic properties of purified BgalPg were determined. **[Results]** BgalPg possessing the conserved motifs of GH13 family is a new member of the GH13_38 subfamily, although it showed low sequence identity with characterized α -amylase family proteins. BgalPg demonstrated no catalytic activity against any substrates of the α -amylase family, while it had the activities towards *p*NP- β -D-galactopyranoside [*p*NP- β -Gal, (2.8 \pm 0.4) U/mg] and *o*NP- β -D-galactopyranoside [*o*NP- β -Gal, (1.4 \pm 0.3) U/mg]. Moreover, the enzyme hydrolyzed lactose [(0.40 \pm 0.01) U/mg], which represented a typical β -galactosidase activity. BgalPg exhibited high stability in pH 7.0–8.5 and the half-life time of 1.5 h at 60 °C. **[Conclusion]** This is the first time that an enzyme of GH13 family was biochemically defined as a novel β -galactosidase.

Keywords: glycoside hydrolase family 13 (GH13); GH13_38 subfamily; β -galactosidase; thermostability

海洋溶解有机质(oceanic dissolved organic matter, DOM)主要来源于表层海水中的藻类和浮游植物, 其碳含量与陆地生物质的碳含量或大气中的二氧化碳含量大致相同^[1]。在表层水中, 发光杆菌属(*Photobacterium*)的细菌占绝对优势, 是海洋碳循环的重要贡献者^[2]。我们注意到其中的潮滩发光杆菌(*P. gaetbulicola*)分布也很广泛, 而且具有非常丰富的碳水化合物酶类, 因此本研究尝试研究该菌中的糖苷酶, 为了解海洋 DOM 的细菌降解提供线索。

β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, EC 3.2.1.23)又称为乳糖酶, 其标志性反应是把 β -1,4 糖苷键连接的乳糖水解为半乳糖和葡萄糖; 绝大部分 β -半乳糖苷酶还具有转糖苷活性, 能催化半乳糖聚合, 形成低聚半乳糖^[3]。 β -半乳糖苷酶广泛地分布在古菌、细菌、真菌、植物和动物中; 在碳水化合物酶数据库 CAZy 中, 基于序列的相似性, β -半乳糖苷酶被划分在 4 个糖苷水解酶家族(glycoside hydrolase family, GH), 即 GH1、GH2、GH35 和 GH42。GH1 和 GH2 的 β -半乳糖苷酶的主要功能是水解乳糖; GH35 的 β -半乳糖苷酶多来源于植物, 与 GH42 的 β -半

乳糖苷酶一样, 主要功能是水解不同的 β -1,3、 β -1,4 和 β -1,6 半乳糖苷键^[4]。

自然界的绝大多数 α -淀粉酶隶属于 GH13 家族, 该家族是最大的糖苷酶水解家族, 也是 α -淀粉酶家族中的主要成员之一。GH13 家族包含超过 8 万条蛋白序列, 含有 31 种不同的酶且无半乳糖苷酶; 目前在 CAZy 数据库中, GH13 家族已经被进一步划分为 45 个亚家族^[5-6]。其中 GH13_38 亚家族是 2019 年发现的新的亚家族^[7]。酶的功能研究远远赶不上数据库中新蛋白数量的增加速度。Helbert 等筛选了尚未开展生理功能研究的 564 条糖苷酶序列, 实验测试了它们的催化底物, 划分出 25 个新的亚家族, 其中包括 GH13_38 亚家族^[7]。目前, CAZy 中 GH13_38 亚家族包含了 1 076 条蛋白序列, 但是依然只有 Helbert 等测试的 2 个酶被实验鉴定过, 其他都是根据蛋白序列特征划分。由于这 2 个酶能水解麦芽糖苷键, 被鉴定为 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, EC 3.2.1.20), 所以目前 GH13_38 亚家族被描述为仅含有 α -葡萄糖苷酶的亚家族^[7]。

本课题组在潮滩发光杆菌的基因组信息中

发现一个 α -淀粉酶家族的蛋白 BgalPg, 其蛋白序列新颖, 未见报道。基于 BgalPg 可能是一个新型葡萄糖苷酶或淀粉酶的猜测, 本研究对 BgalPg 基因进行了克隆和重组表达, 通过分析重组 BgalPg 的酶学性质来鉴定酶的类别, 为理解海洋 DOM 降解提供新线索。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体和培养基

潮滩发光杆菌 Gung47 菌株购自韩国菌种保藏中心(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, 编号 22804)。大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞购自生工生物工程(上海)股份有限公司。载体 pET-32a(+)由本实验室保存。大肠杆菌用 LB 培养基培养。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组抽提试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 葡萄糖检测试剂盒(Glucose Kit), BBI 公司; 对硝基苯- β -D-半乳糖苷(*p*-NP- β -D-galactopyranoside, *p*NPG)、邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(*o*-NP- β -D-galactopyranoside, *o*NPG)等糖苷类底物均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 商品化低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS), Friesland 公司。离子色谱仪, Dionex 公司; CarboPac PA1 糖色谱柱, Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 序列分析和进化树构建

利用 NCBI 数据库的 BLASTp 程序对 BgalPg 的序列进行同源性搜索。采用已经解析蛋白三维结构的典型 GH13 家族成员 α -淀粉酶 AmyP 作为模板^[8], 对保守性氨基酸进行定位; 根据

Janeček 描述的 GH13 家族中 GH13_1、GH13_2、GH13_19、GH13_22、GH13_26、GH13_37、GH13_38、GH13_41 和 GH13_42 亚家族的典型代表^[9], 一共提取了 18 条蛋白。从 NCBI 数据库下载这些蛋白的氨基酸序列。根据 GH13 家族的分类原则, 选取覆盖(β/α)₈桶状催化结构域中 β 1 到 β 8 股的区域(约 300 个氨基酸)进行序列比对^[9-10]。序列比对的软件为 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)和 Color Align Properties (http://www.bioinformatics.org/sms2/color_align_prop.html), 采用 MEGA 5 软件的邻近法将这 18 条蛋白序列和 BgalPg 构建系统发育树。

1.2.2 BgalPg 的克隆、表达和纯化

用细菌基因组抽提试剂盒抽提潮滩发光杆菌 Gung47 的基因组 DNA。根据 NCBI 数据库公布的 Gung47 菌株基因组中的 BgalPg 基因序列设计正向引物 P1 (5'-CGCGGATCCATGACA GATTTTACGCATTC-3') (下划线处为 BamH I 酶切位点)和反向引物 P2 (5'-CCGCTCGAGGTTA GCTAGTGAGAAAGCA-3') (下划线处为 Xho I 酶切位点)。以潮滩发光杆菌 Gung47 的基因组 DNA 为模板扩增 BgalPg 基因。PCR 反应体系: 5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺) 10 μ L, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物 P1 或 P2 (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, 基因组模板 1 μ L, PrimeSTAR HS DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 51 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 52 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 12 $^{\circ}$ C 10 min。用 BamH I 和 Xho I 限制酶分别对 BgalPg 基因和 pET-32a(+)载体双酶切, 然后连接并转化 *Escherichia coli* BL21(DE3), 重组子测序验证。带有 BgalPg 的重组菌株用 1 mmol/L IPTG 诱导 12 h 后收集菌体, 经超声破壁(350 W, 工作 3 s, 间歇 2 s, 共 30 min), 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g

离心 10 min 得粗酶液。粗酶液经过 Ni-NTA 亲和层析纯化得到重组 BgalPg 纯蛋白, 用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度。纯化的 BgalPg 蛋白保存在 50 mmol/L 磷酸钠钾缓冲液(pH 7.0)中。

1.2.3 酶活力的测定

β -半乳糖苷酶的活性测定: 一个标准反应体系包含 40 μ L 适量稀释的纯酶液、10 mmol/L pNPG, 磷酸钠钾缓冲液(pH 7.0)补足 500 μ L。40 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后立即加入等体积的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应。室温下 420 nm 处测量吸光值并计算酶活。一个标准酶活力单位(U)定义为: 按照酶活力测定方法, 每分钟分解 pNPG 生成 1 μ mol 对-硝基苯酚(*p*-nitrophenol, pNP)所需的酶量。蛋白浓度采用 Bradford 法测定^[11]。

为了避免错误判断是否有其他酶活, 下面这些酶活力测定的条件是: 反应温度 30–60 $^{\circ}$ C, 每间隔 5 $^{\circ}$ C 设置一个测试点; 反应 pH 4.0–9.0, 每间隔 1.0 设置一个测试点; 人工底物的反应时间为 1 h, 天然底物的反应时间为 2 h; 加酶量为 15–20 mg/mL。为了排除 BgalPg 是金属离子依赖酶的可能性, 在反应液中分别添加 5 mmol/L 淀粉酶家族蛋白常见的酶活促进剂 CaCl_2 和 MgCl_2 。考虑到潮滩发光杆菌是海洋细菌, 为了排除 BgalPg 是盐依赖酶的可能性, 在反应液中分别添加 0.5%–4.0% 的 NaCl 和 KCl。

人工糖苷底物的活性测定: 方法同 β -半乳糖苷酶的活性测定。人工糖苷底物是指以不同糖苷键连接了对硝基苯基团(pNP-)或邻对硝基苯基团(oNP-)的系列底物。如果酶水解了底物中的糖苷键, 释放出的 pNP 或邻-硝基苯酚(*o*-nitrophenol, oNP)会被很灵敏地检测到。

天然的糖类底物的活性测定: 可溶性淀粉、糖原和木聚糖等高分子量聚合糖用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定酶水解释放的具有还原性的寡糖和单糖^[12]。一些

不能用 DNS 法检测的寡糖底物, 例如乳糖、蔗糖、麦芽糖和异麦芽糖等, 因酶水解会释放出葡萄糖, 所以采用葡萄糖检测试剂盒进行测定。海藻酸钠的水解是直接检测酶反应体系是否在 235 nm 处产生吸光值^[13]。剩余的无颜色反应或吸光值变化的底物, 例如昆布多糖(laminaran)和潘糖(panose)等则采用薄层层析法(thin-layer chromatography, TLC)来检查是否产生了新的产物。

1.2.4 TLC 检测水解产物

展层剂为体积比为 5:3:2 的正丁醇:乙醇:水; 显色剂为 95%乙醇和 5%硫酸的混合液。样品在活化的硅胶板上点样, 置于层析缸展层 2 次后, 喷显色剂并置于 90 $^{\circ}$ C 显色 15 min。测试乳糖水解产物时, 乳糖浓度为 180 g/L, 加酶量为 5 mg/mL, 50 $^{\circ}$ C, pH 7.0, 反应 2 h。获得的反应产物过 0.22 μ m 滤膜后进行 TLC 层析。

1.2.5 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)检测乳糖水解产物

商品化 GOS 用超纯水溶解并稀释到 10 mg/L, 过 0.22 μ m 滤膜后备用。离子色谱仪配置了脉冲安培检测器。色谱柱为 CarboPac PA1 糖色谱柱(4 mm \times 250 mm), CarboPac PA1 保护柱(4 mm \times 50 mm), 流动相 A 为 0.2 mol/L NaOH, 流动相 B 为 0.1 mol/L NaOH 和 0.5 mol/L 乙酸钠的混合液, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C。

1.2.6 温度和 pH 对酶活性的影响

最适反应 pH 和 pH 稳定性在 40 $^{\circ}$ C 测定。缓冲液为 50 mmol/L 磷酸钠钾缓冲液(pH 4.0–8.0)和 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 8.5–10.0)。pH 稳定性是将酶在室温下分别孵育在 pH 5.0、6.0、7.0 和 8.5 的缓冲液中, 然后每隔一定时间取出, 在最适反应条件下测定残留的活性。最适反应温度及温度稳定性在 pH 7.0 条件下测定。温度范围为 30–65 $^{\circ}$ C。温度稳定性是将酶分别孵育在 45、50、55、60 $^{\circ}$ C, 然后每隔一定时间取

出, 在最适反应条件下测定残留的活性。最适反应条件中, 测得的最高值定义为 100%; 稳定性测试中, 未孵育的酶活定义为 100%。

2 结果与分析

2.1 BgalPg 的序列分析

BgalPg 来源于潮滩发光杆菌 Gung47 菌株, 其基因全长 1 821 bp, 编码 606 个氨基酸(GenBank 登录号为 AJR05387), BgalPg 蛋白理论分子量为 68.7 kDa, 不含有信号肽。BLAST 分析结果表明, BgalPg 仅与一些发光杆菌属细菌的 α -淀粉酶家族蛋白具有 75% 以上的序列相似性, 这些蛋白都未被生理鉴定过。 α -淀粉酶家族蛋白是一大类酶的统称, 包括 GH13、GH57、GH119 和 GH126 这 4 个家族^[14]。

关于 GH13 家族的研究很多, 其蛋白的催化结构域是典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构, 具有 4-8 个保守序列, 其中的 β_2 、 β_3 、 β_4 、 β_5 和 β_7 股是保守性更高的典型区域。它们都是理论上的催化位点, 也是进行家族分类研究的常用区域。 β_2 股中的氨基酸常包含 GN₄W 特征序列(G 为甘氨酸, W 为色氨酸, N 代表任意氨基酸, 数字代表个数); β_3 股中常包含 DN₄H 特征序列(D 为天冬氨酸, H 为组氨酸); β_4 股中常包含 RND 特征序列(R 为精氨酸); β_5 股中包含谷氨酸 E; β_7 股中有 HD 连续组合^[5,9-10,15]。把 BgalPg 的序列与 GH13 的 8 个亚家族代表序列比较分析后, 这些典型的保守特征序列均在 BgalPg 中找到(图 1A), 因此 BgalPg 属于 GH13 家族。从系统发育树(图 1B)可见, BgalPg 与已知的 GH13_38 亚家族的成员处于同一分支, 因此 BgalPg 属于 GH13_38 亚家族。目前, GH13_38 亚家族中只有 2 个 α -葡萄糖苷酶被实验鉴定过^[7]。BgalPg 与这 2 个蛋白的序列相似性分别是 57% 和 41%。综上所述, BgalPg 的序列较为新颖, 不能从序

列分析直接推测出其催化功能。

2.2 BgalPg 的重组表达和纯化

将 BgalPg 的基因从潮滩发光杆菌 Gung47 菌株的基因组中 PCR 扩增后, 插入载体 pET-32a 中构建重组质粒, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)。测序验证基因序列无误。重组菌经诱导表达、分离和纯化后, 纯酶用 SDS-PAGE 检测, 显示单一条带, 大小与包含 His 标签后的目的蛋白的理论分子量(69.7 kDa)相符(图 2)。

2.3 BgalPg 不能酶解的底物

目前, GH13_38 亚家族成员被全部描述为 α -葡萄糖苷酶。按照底物特异性, α -葡萄糖苷酶划分为 3 类: I 型属于 GH13 家族, 最适底物为蔗糖和芳香基- α -葡萄糖苷(常见使用对硝基苯- α -D-葡萄糖苷, *pNP- α -D-glucopyranoside*); 从 BgalPg 的蛋白一级序列特征看, BgalPg 有属于 I 型 α -葡萄糖苷酶的可能性。II 型和 III 型都属于 GH31 家族, II 型酶的最适底物是麦芽糖和异麦芽糖; III 型酶的最适底物是可溶性淀粉和糖原^[16-17]。为验证 BgalPg 是否具有 α -葡萄糖苷酶活性, 我们在多种条件下, 通过延长反应时间、增加酶量, 测试了 BgalPg 对这 6 种底物的水解能力, 结果发现均无活性。这说明 BgalPg 不是 α -葡萄糖苷酶。

为了鉴定 BgalPg 的催化功能, 我们选用不同糖苷键的人工底物进行了测试, 包括: 对硝基苯- β -D-葡萄糖苷(*pNP- β -D-glucopyranoside*)、邻硝基苯- β -D-葡萄糖苷(*oNP- β -D-glucopyranoside*)、对硝基苯- β -D-葡萄糖醛酸苷(*pNP- β -D-glucuronide*)、对硝基苯- β -D-木糖苷(*pNP- β -D-xylopyranoside*)、对硝基苯- α -D-木糖苷(*pNP- α -D-xylopyranoside*)、对硝基苯- α -D-麦芽糖苷(*pNP- α -D-maltopyranoside*)、对硝基苯- β -D-甘露糖苷(*pNP- β -D-mannopyranoside*)、对硝基苯- β -D-纤维二糖苷(*pNP- β -D-cellobioside*)、对硝基苯- β -D-岩藻糖苷(*pNP- β -D-fucopyranoside*)和

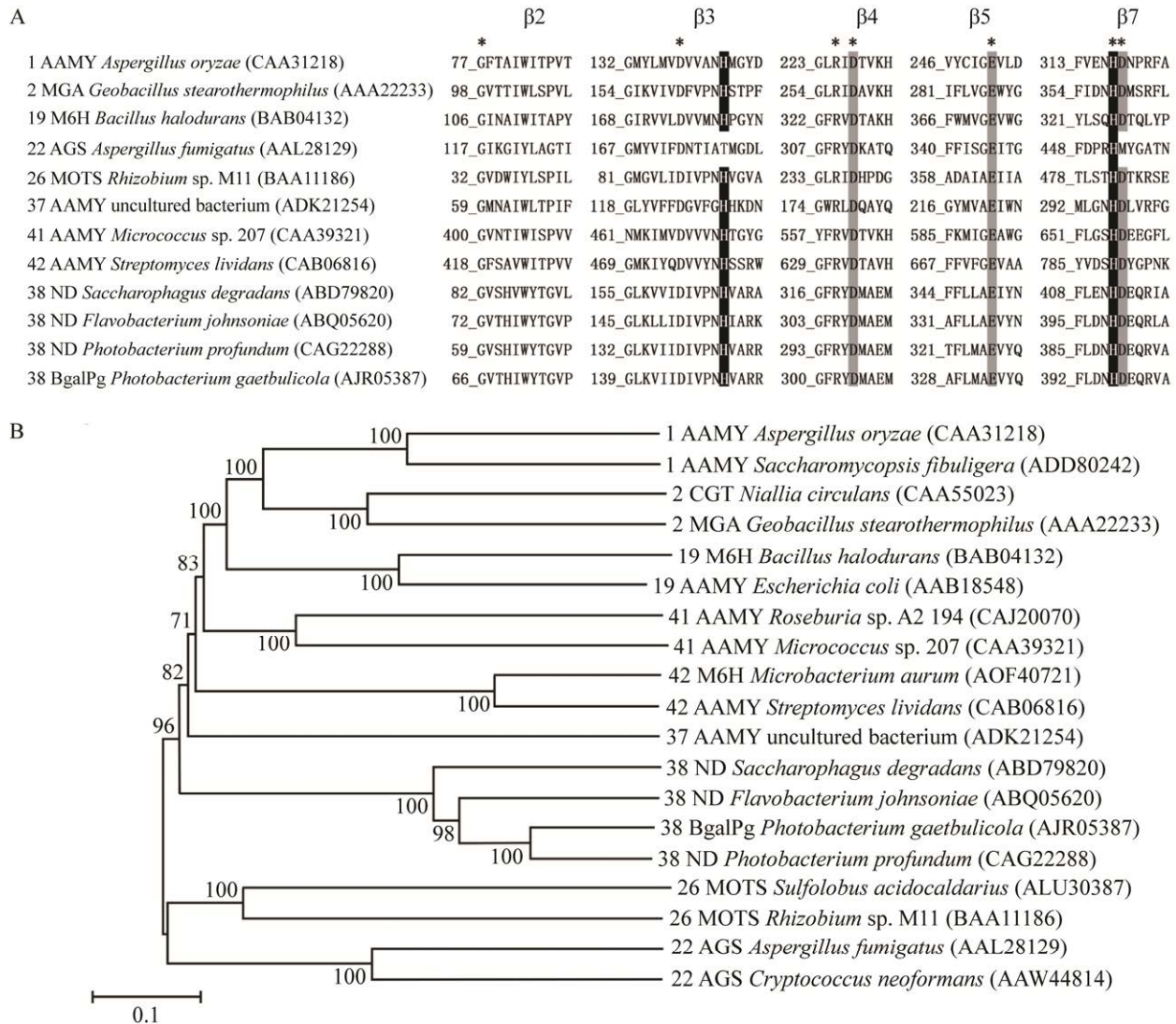


图 1 BgalPg 的序列分析(A)和系统发育树(B) A: BgalPg 的部分氨基酸序列和来自 GH13_1、GH13_2、GH13_19、GH13_22、GH13_26、GH13_37、GH13_38、GH13_41 和 GH13_42 亚家族的典型代表的相应序列的比对^[9]。每条序列注释为亚家族的编号、酶的缩写、宿主菌和 GenBank 登录号; 比对的序列为催化域中(β/α)₈桶装结构中的 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 7$ 和 $\beta 2$ ^[5,9-10,15]; GH13 家族中典型的功能性组氨酸、催化三位点、不变氨基酸分别用黑色、灰色和星号标出。B: 典型代表蛋白的系统进化树。氨基酸序列经过 ClustalX 比对, 基于邻近法建树; 分支处标注有自展值, 标尺 0.1 代表核苷酸替换率

Figure 1 Sequence analysis (A) and phylogenetic tree (B) of BgalPg. A: Partial alignment of the amino acid sequences of BgalPg and the representative members from GH13_1, GH13_2, GH13_19, GH13_22, GH13_26, GH13_37, GH13_38, GH13_41 and GH13_42 subfamilies^[9]. Subfamilies, enzyme abbreviations, bacteria and GenBank accession numbers are indicated; The strands $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 7$ and $\beta 2$ of the catalytic (β/α)₈-barrel domain were the aligned regions^[5,9-10,15]; The functional histidines, catalytic triad and invariant residues of GH13 were signified by black, gray and asterisks, respectively. B: Phylogenetic tree of the representative members. The tree was constructed by the based on the amino acid sequence alignment in ClustalX; The bootstrap values are shown at the nodes; The scale bar indicates 0.1 amino acid replacements per site.

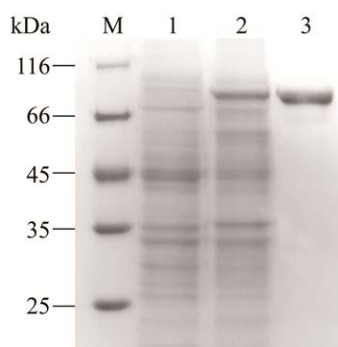


图2 SDS-PAGE分析 BgalPg 的重组表达和纯化
M: 标准蛋白; 1: 含有质粒 pET-32a 的大肠杆菌细胞破碎液; 2: 含有质粒 pET-32a-BgalPg 的大肠杆菌细胞破碎液; 3: 纯化的 BgalPg 蛋白

Figure 2 SDS-PAGE analysis of recombinant BgalPg. M: Size marker proteins; 1: The cell lysates of *Escherichia coli* harboring pET-32a; 2: The cell lysates of *E. coli* harboring pET-32a-BgalPg; 3: The purified BgalPg protein.

对硝基苯- α -L-阿拉伯糖苷(pNP- α -L-arabinofuranoside)。同时还选用了不同的天然底物, 包括蜜二糖(melibiose, Gal α 1-6Glc)、棉子糖(raffinose, Gal α 1-6Glc α 1-2Fru, 是 α -半乳糖苷酶 α -galactosidase 的标志性底物^[18])、潘糖(panose, Glc α 1-4Glc α 1-6Glc)、海藻糖(trehalose, Glc α 1-1Glc)、普鲁兰糖(pullulan, Glc α 1-4Glc α 1-4Glc, 是以 α -1,6 键交替连接的多糖)、木聚糖(xylan, Xyl β 1-4Xyl 交替连接的多糖主链, 侧链被高度取代^[19])、昆布多糖(laminarin, Glc β 1-3Glc 交替连接多糖主链, 侧链是 β -1,6 连接的其他单糖^[20])、海藻酸钠(sodium alginate, 海藻酸的钠盐。海藻酸是 β -D-甘露糖醛酸的醛基以 1,4-糖苷键连接, 形成的大分子多糖)。BgalPg 对上述这些底物均无酶活。

2.4 BgalPg 的 β -半乳糖苷酶活性

BgalPg 对含有 β -半乳糖苷键的底物有酶活。以 pNP- β -Gal 和 oNP- β -Gal 为底物时, 测得酶活分别为[(2.8 \pm 0.4) U/mg]和[(1.4 \pm 0.3) U/mg]。

这表明 BgalPg 能识别 β 型的半乳糖苷键, 符合 β -半乳糖苷酶的催化特征。进一步以乳糖为底物进行 10 min 的水解反应, 测得酶活为 [(0.40 \pm 0.01) U/mg]。

为了证实 BgalPg 确实能水解乳糖, 在酶的最适反应条件下水解 180 g/L 的乳糖 2 h, 水解产物分别进行了 TLC 检测和 HPAEC-PAD 检测。从 TLC 的结果可见, 乳糖被 BgalPg 水解成了半乳糖和葡萄糖, 同时还发现产生了少量分子量更大的低聚寡糖(图 3A)。Vivinal[®]GOS 是环状芽孢杆菌来源的 β -半乳糖苷酶催化形成的 GOS, 其成分研究得比较清楚, 常被用来作为其他 GOS 成分分析的参照^[21-22]。将 BgalPg 的乳糖水解产物与 Vivinal[®]GOS 比较分析, 可以看出 BgalPg 的转糖苷功能类似其他的 β -半乳糖苷酶, 水解产生的半乳糖基和葡萄糖基分子会再次连接, 形成较多的二糖, 以及少量的三糖和四糖(图 3B)。因此, BgalPg 确实是一个新颖的 β -半乳糖苷酶。

2.5 pH 和温度对酶活的影响

如图 4A 所示, BgalPg 在 pH 6.0–7.0 几乎维持不变的最高活性, 在 pH 5.0–8.5 都保持了 85% 以上的活性, 这表明 BgalPg 具有优良的 pH 适应性。同时, 在 pH 5.0–8.5 的范围内, BgalPg 非常稳定(图 4B), 孵育 72 h 后依然保留 73% 以上的活性, 中性偏碱的环境会强化 BgalPg 的稳定性, pH 8.5 条件下, 72 h 的孵育几乎无酶活损失。

BgalPg 的最适温度依然是一个区间, 为 50–55 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C 时保留约 70% 的活性(图 4C), 因此 BgalPg 是一个中温酶。BgalPg 的热稳定性也非常好, 50 $^{\circ}$ C 以下孵育 72 h 活性能保留 80%; 55 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C 的半衰期分别达到约 7.1 h 和 1.5 h。在 60 $^{\circ}$ C 孵育 7 h, BgalPg 才接近丧失活性(7%) (图 4D)。

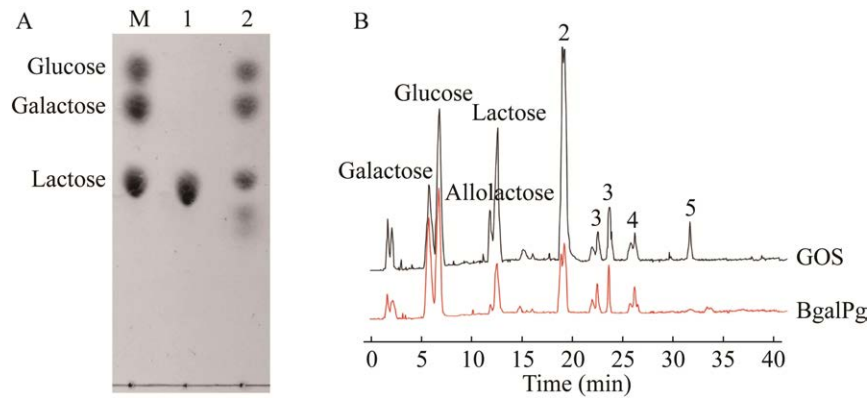


图 3 BgalPg 水解乳糖后的产物分析 A: TLC 检测. M: 葡萄糖、半乳糖和乳糖的混合标准物; 1: 未加酶的乳糖反应液; 2: 加酶后的反应液. B: HPAEC-PAD 检测. 数字 2-5 是根据 Vivinal®GOS 成分标注的低聚半乳糖的聚合度 2-5^[21]

Figure 3 Analysis of reaction products from lactose by incubation with BgalPg. A: TLC analysis. M: Glucose, galactose and lactose mixed standard; 1: Reaction without enzyme; 2: Reaction with enzyme. B: HPAEC-PAD analysis. Numbers 2-5 correspond to galacto-oligosaccharides having a degree of polymerization from 2 to 5, according to Vivinal®GOS^[21].

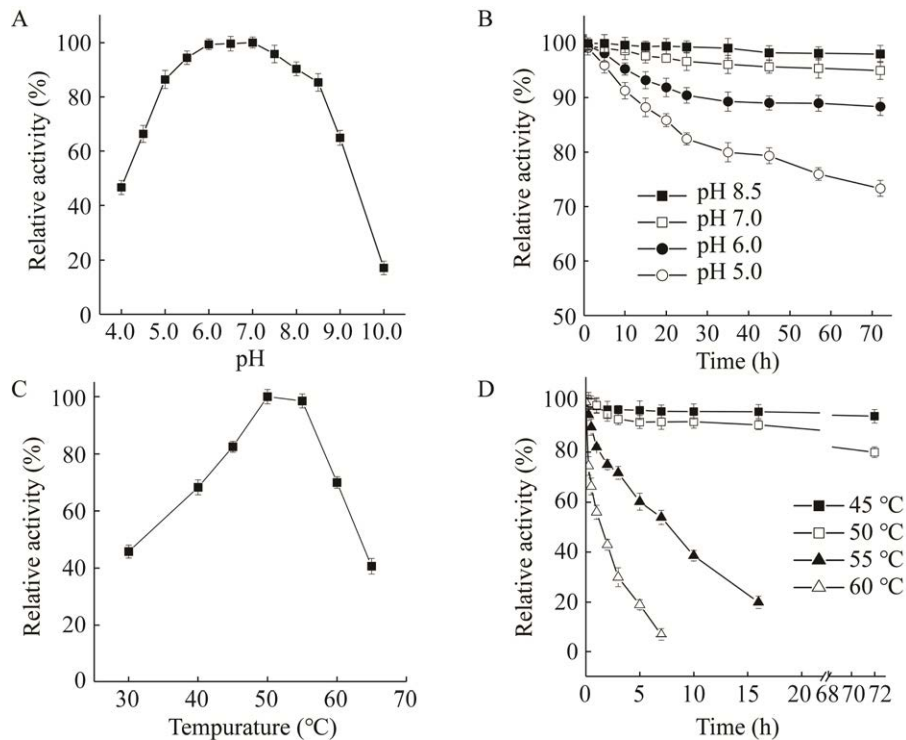


图 4 pH 和温度对酶的影响 A: 最适 pH. B: pH 稳定性. C: 最适温度. D: BgalPg 的温度稳定性. 最高酶活定义为 100%

Figure 4 Effects of pH and temperature on enzyme activity and stability. A: Optimal pH. B: pH stability. C: Optimal temperature. D: Thermal stability of BgalPg. The highest enzymatic activity in certain temperature or pH was set as 100%.

3 讨论与结论

β -半乳糖苷酶的研究非常多, 绝大多数酶分布在4个GH家族(GH1、GH2、GH35和GH42)中^[4], 这些家族的序列特征也有很多研究。BgalPg的序列中显然不具有这些特征。有3个例外的报道: Temuujin等报道从人类粪便的厌氧细菌 *Victivallis vadensis* 中获得一个序列特征符合琼脂糖酶 GH50 家族的蛋白 VadG925, 但是 VadG925 不能水解琼脂糖, 只能水解乳糖类底物, 被鉴定为 β -半乳糖苷酶^[23]。Luis等在人类肠道微生物卵拟杆菌(*Bacteroides ovatus*)

中发现一个序列新颖的 β -半乳糖苷酶, 不能隶属于已知的任何 GH 家族, 因此建议为这个酶及其同源蛋白建立新的 GH147 家族^[24]。Cheng 等报道从土壤宏基因组文库中筛选到具有 β -半乳糖苷酶活性的酶, 但是序列新颖, 未进行家族分类^[25]。由此可见, 与 BgalPg 情况类似的仅有蛋白 VadG925。GH13 家族一直被认为是淀粉酶家族, BgalPg 的发现拓宽了我们对 GH13 家族和 β -半乳糖苷酶分布的理解。

我们把 BgalPg 与隶属于其他 GH 家族的 β -半乳糖苷酶进行性质比较(表 1)。BgalPg 突出的特点是 pH 稳定性和热稳定性都较好。值得

表 1 BgalPg 与隶属于其他 GH 家族的 β -半乳糖苷酶的生化特征比较

Table 1 Comparative biochemical parameters of β -galactosidases from different GH families

物种 Source	物种来源 Origin	GH 家族 GH family	最适温度 Optimum temperature (°C)	热稳定性 Thermostability	最适 pH Optimum pH	pH 稳定性 pH stability	比活 Specific activity (U/mg)	参考文献 References
<i>Photobacterium gaetbulicola</i>	Marine	GH13_38	50–55	Half-life time >72 h (50 °C) 7.1 h (55 °C) 1.5 h (60 °C)	6.0–7.0	72 h incubation at 7.0–8.5	2.8	This study
<i>Halomonas</i> sp. S62	Marine	GH1	45	Inactivity 5 min (60 °C)	7.0	1 h incubation at 6.0–8.5	118.4	[26]
<i>Alteromonas</i> sp. ANT48	Antarctic seawater	GH2	50	Half-life time 1.2 h (50 °C) 0.5 h (60 °C)	7.0	12 h incubation at 6.6–7.0	237.6	[27]
<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	Marine	GH2	45	Inactivity 0.5 h (60 °C)	7.5	0.5 h incubation at 6.0–8.0	45	[28]
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Plant	GH35	45	nd	4.0	nd	0.97	[29]
<i>Prunus avium</i> L.	Plant	GH35	30	nd	4.0	nd	50	[30]
Uncultivated bacterium	Soil metagenomic library	GH42	38	Inactivity 1.0 h (50 °C)	7.0	1 h incubation at 6.0–8.0	109	[31]
<i>Victivallis vadensis</i>	Human fecal	GH50	40	Half-life time 1.0 h (56 °C)	7.0	nd	1.02	[23]

nd: No data.

注意的是, β -半乳糖苷酶是一类热稳定性较差的酶, 不少酶在 60 °C 以下的温度都非常稳定, 一旦超过 60 °C 稳定性急剧下降^[3]。例如, 来源 *Halomonas* sp. S62 的 β -半乳糖苷酶在 60 °C 保温仅 5 min 就会彻底丧失酶活^[26]; 来源 *Paenibacillus barengoltzii* 的 β -半乳糖苷酶在 60 °C 保温 30 min 也彻底丧失了酶活^[28]。因此, BgalPg 在 60 °C 的半衰期能达到 1.5 h, 热稳定性优良。因此, BgalPg 的一个潜在价值是为研究 β -半乳糖苷酶的热稳定性提供了一个较好的材料。

另外, BgalPg 的比酶活较低, 在潮滩发光杆菌中的生理功能暂不明确。我们注意到一些植物来源的 β -半乳糖苷酶在 *p*NP- β -Gal 或 *o*NP- β -Gal 或乳糖为底物时酶活也比较低。植物中该酶的主要功能是通过降解胶质和半纤维素表面的半乳糖基进行水解, 参与细胞壁的软化^[29,32]。考虑到海洋藻类和浮游植物是 DOM 的主要提供源, 因此 BgalPg 的生理功能也许与植物源的 β -半乳糖苷酶有一定的相似性。

本研究通过氨基酸序列分析, 发现海洋细菌潮滩发光杆菌中一个预测为 α -淀粉酶家族蛋白 BgalPg 隶属于 GH13_38 亚家族。将该蛋白重组表达纯化后, 经过生化功能测定, BgalPg 被明确无误地鉴定为 β -半乳糖苷酶。其比酶活低, 但是 pH 稳定性和热稳定性都非常优良。

REFERENCES

- [1] WAGNER S, SCHUBOTZ F, KAISER K, HALLMANN C, WASKA H, ROSSEL PE, HANSMAN R, ELVERT M, MIDDELBURG JJ, ENGEL A, BLATTMANN TM, CATALÁ TS, LENNARTZ ST, GOMEZ-SAEZ GV, PANTOJA-GUTIÉRREZ S, BAO R, GALY V. Soothsaying DOM: a current perspective on the future of oceanic dissolved organic carbon[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 341.
- [2] MACHADO H, GRAM L. Comparative genomics reveals high genomic diversity in the genus *Photobacterium*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1204.
- [3] SAQIB S, AKRAM A, HALIM SA, TASSADUQ R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(1): 79.
- [4] MANGIAGALLI M, LAPI M, MAIONE S, ORLANDO M, BROCCA S, PESCE A, BARBIROLI A, CAMILLONI C, PUCCIARELLI S, LOTTI M, NARDINI M. The co-existence of cold activity and thermal stability in an Antarctic GH42 β -galactosidase relies on its hexameric quaternary arrangement[J]. *The FEBS Journal*, 2021, 288(2): 546-565.
- [5] SARIAN FD, JANEČEK Š, PIJNING T, IHSANAWATI, NURACHMAN Z, RADJASA OK, DIJKHUIZEN L, NATALIA D, van der MAAREL MJE. A new group of glycoside hydrolase family 13 α -amylases with an aberrant catalytic triad[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44230.
- [6] BHANDARI P, TINGLEY JP, PALMER DRJ, ABBOTT DW, HILL JE. Characterization of an α -glucosidase enzyme conserved in *Gardnerella* spp. isolated from the human vaginal microbiome[J]. *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(17): e0021321.
- [7] HELBERT W, POULET L, DROUILLARD S, MATHIEU S, LOIODICE M, COUTURIER M, LOMBARD V, TERRAPON N, TURCHETTO J, VINCENTELLI R, HENRISSAT B. Discovery of novel carbohydrate-active enzymes through the rational exploration of the protein sequences space[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(13): 6063-6068.
- [8] LIU YH, YU JG, LI FD, PENG H, ZHANG XC, XIAO YZ, HE C. Crystal structure of a raw-starch-degrading bacterial α -amylase belonging to subfamily 37 of the glycoside hydrolase family GH13[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44067.
- [9] JANEČEK Š, ZÁMOCKÁ B. A new GH13 subfamily represented by the α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*[J]. *Extremophiles*, 2020, 24(2): 207-217.
- [10] LIU Y, LEI Y, ZHANG XC, GAO Y, XIAO YZ, PENG H. Identification and phylogenetic characterization of a new subfamily of α -amylase enzymes from marine

- microorganisms[J]. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(3): 253-260.
- [11] BRADFORD MM. 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(1/2): 248-254.
- [12] MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [13] 常晴, 束月蓉, 王文韬, 蒋昊, 延泉德, 钱政, 高雪纯, 吴金鸿, 张勇. 来自 *Yeosuana marina* sp. JLT21 内切型海藻酸裂解酶的异源表达及酶学表征[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(2): 123-131.
- CHANG Q, SHU YR, WANG WT, JIANG H, YAN QD, QIAN Z, GAO XC, WU JH, ZHANG Y. Heterologous expression and characterization of endo-type alginate lyase from *Yeosuana marina* sp. JLT21[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(2): 123-131 (in Chinese).
- [14] KERÉNYIOVÁ L, JANEČEK Š. A detailed *in silico* analysis of the amylolytic family GH126 and its possible relatedness to family GH76[J]. *Carbohydrate Research*, 2020, 494: 108082.
- [15] JANEČEK Š, SVENSSON B, MACGREGOR EA. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71: 1149-1170.
- [16] KIM NR, JEONG DW, KO DS, SHIM JH. Characterization of novel thermophilic alpha-glucosidase from *Bifidobacterium longum*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 99: 594-599.
- [17] 李林波, 张士双, 杨天佑, 王宝石, 张明霞. α -葡萄糖苷酶的异源表达及应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(2): 325-332.
- LI LB, ZHANG SS, YANG TY, WANG BS, ZHANG MX. Advancement in heterologous expression and application of α -glucosidase[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(2): 325-332 (in Chinese).
- [18] HUANG Y, ZHANG H, BEN PP, DUAN YJ, LU ML, LI ZK, CUI ZL. Characterization of a novel GH36 α -galactosidase from *Bacillus megaterium* and its application in degradation of raffinose family oligosaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 98-104.
- [19] KHAIRE KC, SHARMA K, THAKUR A, MOHOLKAR VS, GOYAL A. Extraction and characterization of xylan from sugarcane tops as a potential commercial substrate[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 131(6): 647-654.
- [20] KADAM SU, TIWARI BK, O'DONNELL CP. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 50(1): 24-31.
- [21] AKBARI P, FINK-GREMMELS J, WILLEMS RHAM, DIFILIPPO E, SCHOLS HA, SCHOTERMAN MHC, GARSSSEN J, BRABER S. Characterizing microbiota-independent effects of oligosaccharides on intestinal epithelial cells: insight into the role of structure and size[J]. *European Journal of Nutrition*, 2017, 56(5): 1919-1930.
- [22] van LEEUWEN SS, KUIPERS BJH, DIJKHUIZEN L, KAMERLING JP. Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products[J]. *Carbohydrate Research*, 2016, 425: 48-58.
- [23] TEMUJIN U, CHI WJ, PARK JS, CHANG YK, SONG JY, HONG SK. Identification and characterization of a novel β -galactosidase from *Victivallis vadensis* ATCC BAA-548, an anaerobic fecal bacterium[J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(6): 1034-1040.
- [24] LUIS AS, BRIGGS J, ZHANG XY, FARNELL B, NDEH D, LABOUREL A, BASLÉ A, CARTMELL A, TERRAPON N, STOTT K, LOWE EC, McLEAN R, SHEARER K, SCHÜCKEL J, VENDITTO I, RALET MC, HENRISSAT B, MARTENS EC, MOSIMANN SC, ABBOTT DW, GILBERT HJ. Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic *Bacteroides*[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(2): 210-219.
- [25] CHENG JJ, ROMANTSOV T, ENGEL K, DOXEY AC, ROSE DR, NEUFELD JD, CHARLES TC. Functional metagenomics reveals novel β -galactosidases not predictable from gene sequences[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0172545.
- [26] WANG GX, GAO Y, HU B, LU XL, LIU XY, JIAO BH. A novel cold-adapted β -galactosidase isolated from *Halomonas* sp. S62: gene cloning, purification and enzymatic characterization[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(8): 1473-1480.
- [27] LI SY, ZHU XJ, XING MX. A new β -galactosidase

- from the antarctic bacterium *Alteromonas* sp. ANT48 and its potential in formation of prebiotic galacto-oligosaccharides[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(11): 599.
- [28] LIU Y, CHEN Z, JIANG ZQ, YAN QJ, YANG SQ. 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.
- [29] de ALCÂNTARA PHN, MARTIM L, SILVA CO, DIETRICH SMC, BUCKERIDGE MS. Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(11/12): 619-627.
- [30] GERARDI C, BLANDO F, SANTINO A. Purification and chemical characterization of a cell wall-associated β -galactosidase from mature sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 61: 123-130.
- [31] WANG K, LI G, YU SQ, ZHANG CT, LIU YH. A novel metagenome-derived β -galactosidase: gene cloning, overexpression, purification and characterization[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(1): 155-165.
- [32] GUO SL, SONG J, ZHANG BB, JIANG H, MA RJ, YU ML. Genome-wide identification and expression analysis of beta-galactosidase family members during fruit softening of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch][J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 136: 111-123.