

耐高温 β -半乳糖苷酶的分离纯化与酶学性质分析

高兆建, 侯进慧, 孙会刚, 刁进进
(徐州工程学院食品(生物)工程学院, 江苏 徐州 221008)

摘要: 为从嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) XG24 发酵液中纯化到 β -半乳糖苷酶, 并对酶学性质进行研究, 利用硫酸铵分级盐析、DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换层析和 Sephadex G-75 分子筛凝胶过滤层析等方法进行分离纯化。结果表明: 经过系列步骤纯化后, 酶纯度提高了 54.5 倍, 回收率 20.4%, 酶比活力达 32.7 U/mg。以邻-硝基酚-D-半乳糖吡喃糖苷(ONPG)为底物, 研究 β -半乳糖苷酶的酶学性质。最适 pH 6.5, 最适作用温度 65℃。此菌株产 β -半乳糖苷酶在 70℃ 以下和 pH 4.0~8.0 范围内具有较好的稳定性; Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Co^{2+} 对此酶有明显激活作用, 而 Cu^{2+} 、 Ag^{+} 、 Hg^{2+} 几乎完全抑制酶活性。以 ONPG 为底物酶的 K_m 值为 4.32 mmol/L。SDS-PAGE 和凝胶过滤层析测得酶蛋白为单肽链蛋白, 表观分子质量 64 kD。因此, 嗜热脂肪芽孢杆菌 XG24 β -半乳糖苷酶在乳制品工业中具有潜在的应用价值。

关键词: 嗜热脂肪芽孢杆菌; β -半乳糖苷酶; 分离纯化; 性质

Purification and Enzymatic Characterization of Thermostable β -Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* XG24

GAO Zhao-jian, HOU Jin-hui, SUN Hui-gang, DIAO Jin-jin
(College of Food (Biological) Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: The fermentation supernatant of *Bacillus stearothermophilus* XG24 received salting out with ammonium sulfate, separation on DEAE-Sephadex Fast Flow anion exchange column and purification on Sephadex G-75 gel filtration column to obtain high-purity thermostable β -galactosidase, which was subsequently subjected to enzymatic characterization with o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) as a substrate. After the above separation and purification procedures, the purity of this enzyme showed a 54.5-fold increase, with an activity recovery of 20.4%, and the specific activity of the purified enzyme was 32.7 U/mg protein. The optimal pH and temperature for the reaction of this enzyme were 6.5 and 65 °C, respectively. It was stable at temperatures below 70 °C or in a pH range between 4.0 and 8.0. Its activity was notably promoted by Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} and Co^{2+} , whereas Cu^{2+} , Ag^{+} and Hg^{2+} were almost able to entirely inhibit its activity. The K_m towards ONPG was determined to be 4.32 mmol/L. The SDS-PAGE analysis revealed that this enzyme was a single-chain protein. Based on the results of Sephadex G-75 gel filtration chromatographic measurement, it was deduced that the apparent molecular weight of this enzyme was 64 kD. Therefore, *Bacillus stearothermophilus* XG24-derived thermostable β -galactosidase has high application potential in the dairy industry.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*; β -galactosidase; purification; characterization

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0151-06

β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, EC 3.2.1.23), 又称乳糖酶, 能够催化 β -D-半乳糖吡喃糖苷水解或者转糖基化。该酶广泛存在于各种动物、植物、细菌、酵母、真菌或霉菌中^[1-3]。 β -半乳糖苷酶将牛乳或其他乳

制品中的乳糖水解为葡萄糖和半乳糖, 降低乳制品中乳糖含量, 提高乳制品的可消化性^[4-5], 广泛用于低乳糖牛奶和非结晶型浓缩牛奶的生产, 解决世界一半以上人口存在的乳糖不耐症问题^[6], β -半乳糖苷酶还具有半乳

收稿日期: 2010-03-21

基金项目: 徐州市博士科研启动基金资助项目

作者简介: 高兆建(1976—), 男, 讲师, 博士, 主要从事微生物次生代谢产物与基因工程。E-mail: gaozhaojian@126.com

糖苷转移作用,用于生产双歧因子-低聚半乳糖^[7-8],从而在益生菌食品生产中被广泛应用。 β -半乳糖苷酶在食品中的重要应用价值引起人们对它的广泛关注。由于微生物的快速生长、高效代谢以及分离纯化相对简单等优势,使微生物 β -半乳糖苷酶成为工业化酶制剂的主要来源。目前乳品工业用于分解乳糖的 β -半乳糖苷酶多从经诱导的酵母、米曲霉、黑曲霉或乳酸菌产酶后提取获得,但是均存在热稳定性差的缺点,严重限制了它在乳制品中的应用。采用高温型 β -半乳糖苷酶能够克服这缺陷。酶在60℃以上温度水解乳糖,可以有助于抑制杂菌微生物的生长,而且酶反应速度快,酶用量低,反应时间短,生产中可与巴氏杀菌同时进行或冷却阶段保温水解。因此,乳糖酶的研究日益引起人们的重视^[9]。

目前,已经筛选分离了多种 β -半乳糖苷酶菌株,如酵母菌^[10]、乳酸菌属^[11]、芽孢杆菌属^[12]、曲霉菌属^[13]等系列菌株。但是,大部分 β -半乳糖苷酶的pH值稳定范围较窄,稳定性较差。故研究热稳定性 β -半乳糖苷酶成为研究的热点,如海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)^[14]、嗜热古细菌(*Pyrococcus woesei*)^[15]、嗜热棉毛菌(*Thermomyces lanuginosus*)^[16]。但对于嗜热脂肪芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶国内尚未见相关报道。本实验室从温泉附近土壤中筛选到一株极高耐热性的嗜热脂肪芽孢杆菌,初步研究发现该菌株所产 β -半乳糖苷酶耐热性强、酶活性高。对酶的纯化和酶学性质研究为今后从分子与结构水平研究 β -半乳糖苷酶的耐热机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DEAE-Sephrose Fast Flow、Sephadex G-75 瑞典 Amersham Pharmacia 公司;考马斯亮蓝、TEMED、聚丙烯酰胺 美国 Amresco 公司;分子质量标准蛋白 上海生物工程公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。

ÄKTA FPLC 蛋白纯化系统 瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司;蛋白电泳仪 美国 Bio-Rad 公司;CR21G II 立式冷冻离心机 日本日立公司。

1.2 菌种

β -半乳糖苷酶高产菌株由本实验室从温泉附近土壤中分离筛选得到。经鉴定并命名为 *Bacillus stearothermophilus* XG24。

1.3 培养基及其培养条件

接种适量的嗜热脂肪芽孢杆菌 XG24 菌悬液于产酶培养基中(乳糖 2g、蛋白胨 2g、CaCl₂ 0.01g、MgSO₄·7H₂O 0.001g、KH₂PO₄ 0.1g、酵母浸膏 0.2g、NaCl 0.015g、FeSO₄·7H₂O 0.001g、MnSO₄·4H₂O 0.001g、蒸馏

水 100mL), pH6.8, 45℃, 150r/min 培养 42h。发酵培养物在 4℃ 条件下 8000r/min 离心 15min, 去除细胞, 上清液作为粗酶液进行下面的分离纯化操作。

1.4 酶的分离纯化

将 500mL 粗酶液在冰浴中边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 40% 饱和度, 4℃ 静置盐析 4h 后 8000r/min 离心 30min, 取上清液继续加入硫酸铵至 70% 的饱和度, 再次离心后收集沉淀, 重新溶于 30mL 20mmol/L 的磷酸缓冲液(pH6.5)中, 并用相同的缓冲溶液彻底透析脱盐。将上述经透析脱盐后的酶液, 12000r/min 离心 30min 后, 上清液加到已用缓冲液 A 平衡的 DEAE-Sephrose Fast Flow (2.5cm × 30cm) 阴离子交换柱上, 先用不含 NaCl 的缓冲溶液 A 洗脱, 直到洗至 A_{280nm} 在 0.02 以下时, 再用 0~1.0mol/L 的 NaCl 进行线性梯度洗脱。含酶组分合并后用聚乙二醇 20000 包埋法浓缩至 2mL, 再上 Sephadex G-75(1.6cm × 90cm) 分子筛凝胶柱, 用含 0.02mol/L NaCl 的 20mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH6.5)进行洗脱, 收集有酶活性部分检测酶纯度及用于酶学性质的研究。

1.5 酶活性测定

参考 Gul-Guven 等^[11]的方法, 并略有改动。取 500 μ L 待测酶液加入到已经预热到 65℃ 的 1.5mL 含有 2mmol/L ONPG 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH6.5)中, 65℃ 水浴保温 10min 后, 加入 1mL 1mol/L 的碳酸钠溶液终止反应, 于 405nm 波长处测定吸光度, 计算水解产物邻硝基酚的含量和酶的活性, 同时以 0.1mol/L pH6.5 磷酸缓冲液代替酶液作为对照。乳糖酶活性的定义: 1 个单位的乳糖酶的活性为在 pH6.5, 65℃ 条件下每分钟分解 ONPG 生成 1 μ mol 邻硝基酚(ONP)所需的酶量。

1.6 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度测定采用 Lowry 法^[17], 以牛血清白蛋白制作标准曲线对蛋白质浓度进行定量。

1.7 分子质量的测定

1.7.1 凝胶过滤法

蓝色葡聚糖上样 Sephadex G-75 凝胶色谱柱, 测定柱空隙体积(V_0), 然后上样标准蛋白及样品蛋白, 测定各蛋白的洗脱体积(V_e), 以各标准蛋白的洗脱体积同柱空隙体积的比率(V_e/V_0)同标准蛋白的分子质量对数($\lg M_w$)制作标准曲线。然后从标准曲线中求出该 β -半乳糖苷酶的表观分子质量。标准蛋白为兔磷酸化酶 B、牛血清白蛋白、兔肌动蛋白、胰蛋白酶抑制剂、鸡蛋清溶菌酶作标准蛋白。

1.7.2 SDS-PAGE 电泳

按 Laemmli 等^[18]的方法进行 SDS-PAGE 电泳, 分离胶 10%, 浓缩胶 5%。将样品及标准蛋白(兔磷酸化酶 B (97400D)、牛血清白蛋白(66200D)、兔肌动蛋白

(43000D)、牛碳酸酐酶(31000D)、胰蛋白酶抑制剂(20100D)、鸡蛋清溶菌酶(14400D))进行 SDS-PAGE, 然后以相对迁移率对分子质量作图, 从图中求出该 β -半乳糖苷酶的分子质量。

1.8 β -半乳糖苷酶性质研究

1.8.1 温度和 pH 值的影响

将反应体系分别置于 30~85℃ 的水浴中进行反应, 测定 β -半乳糖苷酶活力, 确定最适反应温度。酶热稳定性的测定是取同样浓度的 β -半乳糖苷酶分别置于 40、50、60、70、80℃ 的水浴中, 每隔 1h 取样测定残余酶活力, 用保存在 4℃ 冰箱的相同酶液所测得的酶活性作为空白, 设为 100%, 共测定 4h。

纯化后的 β -半乳糖苷酶在不同 pH4.0~10.0 条件下进行酶促反应以测定其最适 pH 值。测定 pH 值稳定性是将酶液加入到 100mmol/L 的不同 pH 值缓冲液中, 再于 40℃ 保温 1h, 然后按照标准方法测定剩余 β -半乳糖苷酶的活性。所用缓冲液为: pH4.0~5.5 的醋酸钠缓冲液、pH6.0~7.5 的磷酸钠缓冲液、pH8.0~9.0 的 Tris-HCl 缓冲液、pH9.0~10.5 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。以 β -半乳糖苷酶在 pH6.5 时所测的酶活力为 100%, 其他 pH 值条件下所测为相对酶活力。

1.8.2 金属离子的影响

取适当稀释的酶液, 向其中分别加入用蒸馏水配制的金属盐溶液, 40℃ 保温 1h 后, 标准方法测定残余酶活力。金属盐分别为: NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、MnSO₄、FeCl₂、CoCl₂、CuSO₄、ZnSO₄、AgNO₃、HgCl₂。

1.8.3 酶 K_m 值的测定

在 pH6.5、温度 65℃ 的条件下, 分别将 ONPG 稀释到终含量 0~1%, 测定 β -半乳糖苷酶在不同底物浓度下的酶活力。根据 Lineweaver-Burk 方程, 求此条件下的 K_m 值。

2 结果与分析

2.1 β -半乳糖苷酶分离与纯化

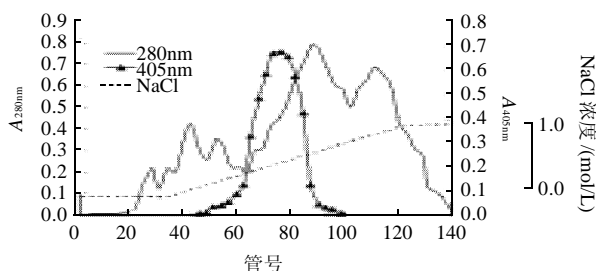


图1 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析

Fig.1 DEAE-Sepharose fast flow ion exchange chromatographic separation of thermostable β -galactosidase

采用了硫酸铵分段盐析、透析、DEAE-Sepharose fast flow 离子交换层析、分子筛凝胶过滤层析等纯化手段从嗜热脂肪芽孢杆菌 XG24 发酵液中分离纯化 β -半乳糖苷酶。柱层析纯化结果分别见图 1、2, 纯化的检测结果见图 3。

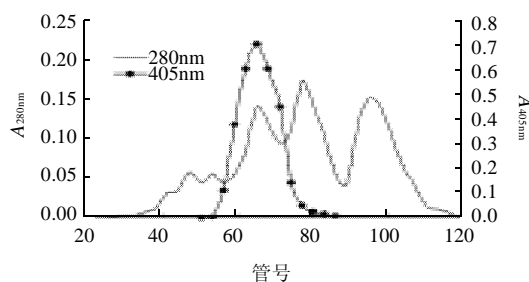
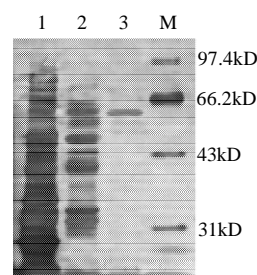


图2 Sephadex G-75 分子筛凝胶过滤层析

Fig.2 Sephadex G-75 gel filtration chromatographic purification of thermostable β -galactosidase



1.硫酸铵盐析; 2.离子交换层析; 3.分子筛凝胶过滤层析; M.标准分子质量蛋白。

图3 β -半乳糖苷酶 SDS-PAGE 图谱
Fig.3 SDS-PAGE of thermostable β -galactosidase at different separation and purification steps

硫酸铵分段盐析显示, 在 40% 饱和度以下, 沉淀蛋白中酶活性较弱, 而上清液中检测到较高的酶活性, 在硫酸铵饱和度 70% 以上时, 沉淀 β -半乳糖苷酶活性较低。综合考虑到酶的纯化效率和回收率, 选择 40%~70% 饱和度的硫酸铵盐析。沉淀后的粗酶蛋白溶解在磷酸缓冲液中, 充分透析脱盐及小分子的杂蛋白和色素。

彻底脱盐后的粗酶液上样经过充分平衡的离子交换柱, NaCl 线性梯度洗脱显示, 分离得到 3 个较大的蛋白主峰, 收集管酶活性检测到一个酶活性峰, 主要在第二个蛋白峰的左侧, 所对应的 NaCl 洗脱浓度为 0.5mol/L。从洗脱曲线看出, 离子交换层析效率较高, 能够去除大部分的杂蛋白, 但酶活性峰的对应位置没有明显清晰的蛋白峰, 说明酶液中含有杂蛋白。合并有酶活性的收集管, 采用聚乙二醇 20000 包埋法浓缩后, 上样 Sephadex G-75 凝胶柱, 进一步纯化。凝胶柱层析洗脱曲线显示 3 个清晰的蛋白峰, 酶活性检测到第一个蛋白

峰有极强的酶活性,而第二和第三个蛋白峰均没有酶活性。合并有活性的收集管酶液,进一步电泳检测以及用于酶的性质研究。SDS-PAGE 检测结果表明发酵液中的粗酶液经以上纯化步骤后,酶纯度达到电泳均一,纯化各步骤相应的酶活性、蛋白浓度、产率和纯化倍数见表 1。

表 1 β -半乳糖苷酶的分离纯化

Table 1 A summary of purification steps of thermostable β -galactosidase from *B. stearothermophilus* XG 24

纯化步骤	总活力/U	总蛋白/mg	比活力/(U/mg)	产率/%	纯化倍数
粗提物	1246	2047	0.61	100	0
硫酸铵盐析	678	348	2	54.4	3.2
Sepharose FF	424.5	38.5	11	34	17.7
Sephadex G-75	254.7	7.8	32.7	20.4	54.5

由表 1 可知,酶纯化了 54.5 倍,比活力达到 32.7U/mg,产率为 20.4%。采用一系列层析技术从不同的微生物发酵液中分离纯化到 β -半乳糖苷酶^[11,19-20],而本研究从嗜热脂肪芽孢杆菌 XG24 发酵液中发现 β -半乳糖苷酶并分离纯化到电泳纯的酶蛋白。

经各步骤纯化后的酶液 SDS-PAGE 电泳后硝酸银染色结果如图 3 所示。硫酸铵盐析后的酶液电泳后有较多的杂蛋白存在,经过离子交换层析后,杂蛋白明显减少,最后分子筛凝胶过滤层析后,显示单一的一条蛋白带,表明纯化后的酶蛋白达到电泳纯,同标准分子质量蛋白对照显示纯化到的 β -半乳糖苷酶分子质量约为 64kD。通过 Sephadex G-75 色谱柱测定酶蛋白分子质量为 63.5kD。由此推断,纯化到的 β -半乳糖苷酶含有一个蛋白亚基,表观分子质量为 64kD。与所报道的嗜热踝节菌(*Talaromyces thermophilus*)(50kD)^[19]相似,但比来源于棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)(120kD)^[13]、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)(530kD)^[21]、嗜热硫酸化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)(240kD)^[22]要小许多。故推测从嗜热脂肪芽孢杆菌 XG24 中所纯化到的 β -半乳糖苷酶可能为一种新的 β -半乳糖苷酶的同工酶。

2.2 β -半乳糖苷酶的酶学性质

2.2.1 β -半乳糖苷酶最适作用温度和热稳定性

如图 4 所示,在温度 50~75℃ 的范围内所测 β -半乳糖苷酶活力都在 60% 以上,最适反应温度为 65℃。酶的热稳定性实验结果如图 5 所示,酶在 50℃ 保温 2h 酶活力残留 92%,60℃ 保温 2h 残留在 85%,70℃ 保温 2h 残留 65% 活力,80℃ 保温 2h 残留 24% 活力。热稳定性实验表明嗜热脂肪芽孢杆菌 XG24 β -半乳糖苷酶具有强的热稳定性,比来源于嗜酸乳杆菌(*Allicyclobacillus*

acidocaldarius)^[11]、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)^[23]等菌株的 β -半乳糖苷酶稳定性要高。同目前的研究报道相比较,从嗜热脂肪芽孢杆菌 XG24 纯化到的 β -半乳糖苷酶是国内外所报道的 β -半乳糖苷酶中耐热性最强的酶之一。酶的耐热性强在酶工业化应用中具有很多优势,酶在高温下处理样品,可以抑制微生物的生长^[24],防止乳制品杂菌污染。而且高温下水解反应速度快,时间短,可以大量地节约成本,提高生产效率。目前,耐高温 β -半乳糖苷酶在乳制品加工业中备受关注,具有广阔的应用前景。

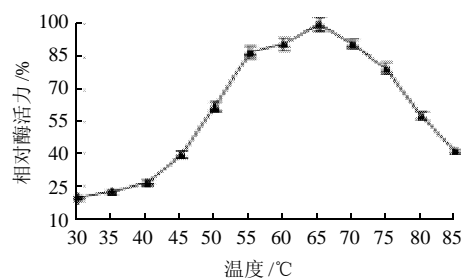


图 4 温度对 β -半乳糖苷酶活性的影响

Fig.4 Effect of temperature on thermostable β -galactosidase activity

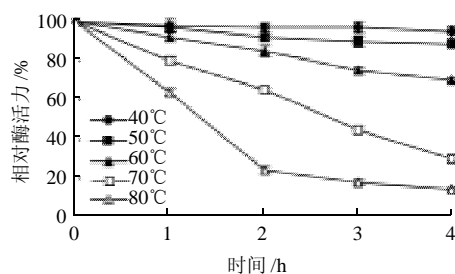


图 5 温度对 β -半乳糖苷酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on thermostable β -galactosidase stability

2.2.2 β -半乳糖苷酶最适作用 pH 值及 pH 值稳定性

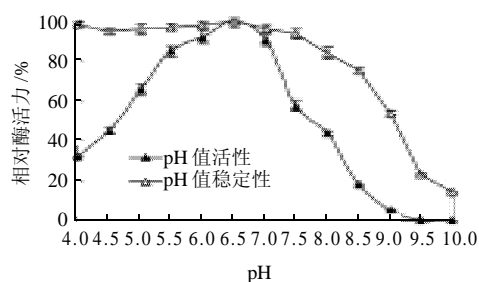


图 6 pH 值对 β -半乳糖苷酶活性及稳定性的影响

Fig.6 Effect of pH on thermostable β -galactosidase activity and stability

表2 金属离子对 β -半乳糖苷酶活性的影响
Table 2 Effect of metal ions on thermostable β -galactosidase activity

金属离子浓度/(mmol/L)	相对酶活力/%											
	对照	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Hg ²⁺	Ag ⁺
1	100 ± 3.2	100 ± 2.1	101 ± 1.8	112 ± 2.6	91 ± 3.1	132 ± 3.4	115 ± 1.6	109 ± 0.8	34 ± 0.4	94 ± 0.3	7 ± 0.2	10 ± 0.4
10	100 ± 2.0	106 ± 1.0	100 ± 2.1	146 ± 1.9	87 ± 1.8	121 ± 2.7	114 ± 1.2	116 ± 1.6	17 ± 0.2	87 ± 0.4	0	0

纯化后的 β -半乳糖苷酶在不同pH值的缓冲体系、65℃条件下测定的酶活性,结果如图6所示, β -半乳糖苷酶在pH5.5~7.0之间酶活力在85%以上,最适作用pH值为6.5,同所报道的嗜热球菌 β -半乳糖苷酶最适pH值(pH6.0)^[11]接近,但比源于棘孢曲霉的 β -半乳糖苷酶最适pH值(pH5.4)^[13]稍高。 β -半乳糖苷酶在一系列不同pH值的缓冲液中40℃条件下处理1h后,再在最适pH值下测定酶活性,结果表明,在pH4.0~7.5之间保持90%以上的酶活性,而在pH7.5以上,酶活性则急速下降,表明 β -半乳糖苷酶在弱酸性环境下非常稳定。鉴于多数乳制品饮料的pH值也在这一范围内,故该酶的这些生化特性赋予了嗜热脂肪芽孢杆菌XG24 β -半乳糖苷酶乳制品加工中有极大的应用优势,因此该酶有着潜在的市场应用价值。

2.2.3 β -半乳糖苷酶的反应动力学

固定 β -半乳糖苷酶的量,以不同浓度ONPG溶液为底物,测定酶反应速度。采用Lineweaver-Burk作图法,求得嗜热脂肪芽孢杆菌XG24 β -半乳糖苷酶对ONPG的 K_m 为4.32mmol/L。同所报道的 β -半乳糖苷酶相比较,如嗜热球菌的 K_m 为8.9mmol/L^[11]、栖热菌属细菌(*Thermus*)的 K_m 为5.9mmol/L^[9]、嗜冷动性球菌(*Planococcus*)的 K_m 为9mmol/L^[25],嗜热脂肪芽孢杆菌XG24 β -半乳糖苷酶同底物ONPG的亲合力较强。

2.2.4 金属离子对 β -半乳糖苷酶的影响

在酶反应液中分别加入不同的金属离子使其终浓度为1mmol/L和10mmol/L。表2显示:Cu²⁺、Ag⁺、Hg²⁺在所检测范围内几乎完全抑制酶的活性,Ca²⁺、Zn²⁺具有较弱的抑制活性。Na⁺、K⁺对酶活性的作用不明显;Mg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺和Co²⁺对酶活性均有促进作用,Fe²⁺、Mn²⁺在低浓度时激活作用更强,而Mg²⁺、Mn²⁺在高浓度时激活作用较强。

3 讨 论

分离筛选极端环境下的一些产生极端生化特性酶的微生物菌株一直是研究的热点。本实验室从温泉附近土壤中分离筛选到一株产生 β -半乳糖苷酶的极端耐热菌株。从菌株发酵液中分离纯化到了电泳均一的 β -半乳糖苷酶。纯化步骤简单、操作简便,大大减少酶的损失,回收率高。

酶学性质研究表明, β -半乳糖苷酶最适作用pH值

为6.5,温度为65℃。同时具有强的热稳定性,是典型的耐热型 β -半乳糖苷酶。这些生化特性赋予了该酶在乳制品加工中有极大的应用优势。酶活性长时间保持稳定,并具有较好的酶活力,保存相对比较容易,可以应用于一般条件下的工业生产。也可以在温度较高的环境下使用,因此,该极耐热性 β -半乳糖苷酶具有很好的工业应用前景。

本研究着重对酶的分离纯化和酶学性质进行了研究,并对其工业应用前景进行了探讨和展望。但对该酶耐热的分子机制研究还处于探索阶段。对该酶的分子机制的更进一步研究将有利于后续更多微生物极端酶的开发和利用。

参考文献:

- [1] HIDAOKA M, FUSHINOBU S, OHTSU N, et al. Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 β -galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 322: 79-91.
- [2] MORACCI M, NUCCI R, FEBBRAIO F, et al. Expression and extensive characterization of a β -glycosidase from the extreme thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* in *Escherichia coli*: authenticity of the recombinant enzyme[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17: 992-997.
- [3] LADERO M, SANTOS A, GARCIA J L, et al. Studies on activity and the stability of β -galactosidases from *Thermus* sp. strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30: 392-405.
- [4] GREENBERG N A, MAHONEY R R. Immobilization of lactase (β -galactosidase) for use in dairy processing: a review[J]. Process Biochemistry, 1981, 16: 2-8.
- [5] GEKAS V, LOPEZ-LEIVA M. Hydrolysis of lactose: a literature review [J]. Process Biochemistry, 1985, 20: 2-12.
- [6] RINGS E H, van BEERS E H, KRASINSKI S D, et al. Lactase: origin, gene expression, localization and function[J]. Nutrition Resource, 1994, 14: 775-797.
- [7] KARASOVÁ-LIPOVOVÁ P, STRNAD H, SPIWOK V, et al. The cloning, purification and characterisation of a cold-active β -galactosidase from the psychrotolerant Antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. C2-2 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33: 836-844.
- [8] HUNG M N, LEE B H. Purification and characterisation of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58: 439-445.
- [9] OHTSU N, MOTOSHIMA H, GOTO K, et al. Thermostable beta-galactosidase from an extreme thermophile *Thermus* sp. A4: enzyme purification and characterisation, gene cloning and sequencing[J]. Bio-science Biotechnology and Biochemistry, 1998, 62: 1539-1545.
- [10] DOMINGUES L, LIMA N, TEIXEIRA J A. *Aspergillus niger* β -galac-

- tosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1151-1154.
- [11] GUL-GUVEN R, GUVEN K, POLI A, et al. Purification and some properties of β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 1570-1577.
- [12] SCHALLMEY M, SINGH A, WARD O P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(1): 1-17.
- [13] van CASTEREN W H M, EIMERMAN M, van den BROEK L A M, et al. Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891[J]. Carbohydrate Research, 2000, 329: 75-85.
- [14] LI Lite, ZHANG Min, JIANG Zhengqiang, et al. Characterisation of a thermostable family 42 β -galactosidase from *Thermotoga maritima*[J]. Food Chemistry, 2009, 112: 844-8502.
- [15] DABROWSKI S, MACIUN SKA J, SYNOWIECKI J. Cloning and nucleotide sequence of the thermostable β -galactosidase gene from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme[J]. Molecular Biotechnology, 1998, 10(3): 217-222.
- [16] FISCHER L, SCHECKERMANN C, WAGNER F. Purification and characterization of a thermotolerant β -galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1497-1501.
- [17] PETERSON G L. Determination of total protein[J]. Methods in Enzymology, 1983, 91: 86-105.
- [18] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [19] NAKKHARAT P, HALTRICH D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123: 304-313.
- [20] BIAKOWSKA A M, CIEŚLIŃSKI H, NOWAKOWSKA K M, et al. A new β -galactosidase with a low temperature optimum isolated from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 20B: gene cloning, purification and characterization[J]. Archives of Microbiology, 2009, 191: 825-835.
- [21] GREENBERG N A, MAHONEY R R. Production and characterization of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Food Science, 1982, 47: 1824-1835.
- [22] PISANI F M, RELIA R, RAIA C A, et al. Thermostable β -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* purification and properties[J]. European Journal of Biochemistry, 1990, 187: 321-328.
- [23] NAGY Z, KISS T, SZENTIRMAI A, et al. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme[J]. Protein Expression and Purification, 2001, 21: 24-29.
- [24] HAKI G D, RAKSHIT S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review[J]. Bioresource Technology, 2003, 89: 17-34.
- [25] SHERIDAN P P, BRECHLEY J E. Characterization of a salt-tolerant family 42 β -galactosidase from a psychrophilic Antarctic *Planococcus* isolate[J]. Applied and Environment Microbiol., 2000, 66: 2438-2444.