

## 乳杆菌乳糖酶的基因异源表达及酶学性质分析

章沙沙<sup>1,2</sup>, 张宇宏<sup>2</sup>, 樊晓虎<sup>2</sup>, 刘素纯<sup>1</sup>, 刘仲华<sup>3</sup>, 张伟<sup>2</sup>

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙 410128; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081;  
3. 湖南农业大学园林园艺学院, 长沙 410128)

**摘要:**采用简并引物 PCR 和 TAIL-PCR 方法,从乳杆菌 *Lactobacillus* sp. B164 中克隆得到一个乳糖酶基因 *bg42-164*。基因全长 2 031 bp, 编码 676 个氨基酸和一个终止密码子, 预测分子量 76 kDa, 无信号肽序列。将 *bg42-164* 连接 pET-30a(+) 载体并转入大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达后可检测到乳糖酶活力。SDS-PAGE 分析乳糖酶 BG42-164 的蛋白分子量为 76 kDa, 使用组氨酸标签亲和层析方法进行蛋白纯化, 并对纯化的乳糖酶 BG42-164 进行了酶学性质分析。该酶最适反应温度为 50℃, 经 50℃ 处理 30 min 后, 剩余酶活力保留 80% 以上, pH 6.0 时该酶的水解活力最高。牛奶水解试验表明, 乳糖酶 BG42-164 对乳糖的水解效果良好, 5 mL 牛奶中添加 250 U 酶蛋白, 在 50℃ 条件下 2 h 乳糖水解率为 100%。该酶温度范围宽, 乳糖水解效果好, 为在低乳糖奶生产中应用奠定了理论基础。

**关键词:**乳杆菌; 乳糖酶;  $\beta$ -半乳糖苷酶; 基因表达

**doi:**10.3969/j.issn.1008-0864.2011.03.09

**中图分类号:**Q786, Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0864(2011)03-0053-07

## Expression of Lactase Gene from *Lactobacillus* sp. and its Enzymology Characteristics Analysis

ZHANG Sha-sha<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu-hong<sup>2</sup>, FAN Xiao-hu<sup>2</sup>, LIU Su-chun<sup>1</sup>,  
LIU Zhong-hua<sup>3</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hu'nan Agricultural University, Changsha 410128;  
2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;  
3. College of Horticulture and Gardening, Hu'nan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** A lactase gene *bg42-164* was cloned from a *Lactobacillus* sp. B164 strain using degenerate PCR and TAIL-PCR technology. The 2 031 bp *bg42-164* gene encodes 676 amino acid residues and one stop codon, and its predicted molecular weight was 76 kDa without signal peptide. The *bg42-164* gene was inserted into pET-30a(+) vector and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) to detect the lactase activity after induced by IPTG. Apparent molecular weight of the recombinant enzyme was about 76 kDa by SDS-PAGE. The enzymology character of this enzyme was analyzed after purified by histidine-tag affinity chromatography. The optimum temperature of BG42-164 was 50℃, approximately 80% of the activity remained after incubation at 50℃ for 30 min. The optimum pH of lactase activity was 6.0. With additional 250 U lactase BG42-164 per 5 mL milk, the hydrolysis rate of lactose was 100% at 50℃ for 2 h. The results illustrate considerable thermo-stability and hydrolysis ability of the BG42-164, which would provide a theoretical basis for further preparation of lactose-free milk.

**Key words:** *Lactobacillus*; lactase;  $\beta$ -galactosidase; gene expression

牛乳是人类改善营养, 增强体质不可缺少的理想食品。但由于我国人群中有一大部分(约 60%~80%)体内缺乏乳糖酶, 无法有效水解

牛乳中的乳糖从而阻碍了其乳制品中的营养充分消化吸收, 更甚者饮用乳制品后会引发腹胀、腹泻等症状, 即通常所说的乳糖不耐受症, 这一状况

收稿日期: 2011-01-28; 接受日期: 2011-03-23

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA020201; 2007AA02Z204)资助。

作者简介: 章沙沙, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: zhangshasha198479@hotmail.com。通讯作者: 张伟, 副研究员, 博士, 主要从事微生物基因工程研究。Tel: 010-82106141; E-mail: zwcaas@hotmail.com

严重影响了牛乳及乳制品的推广<sup>[1,2]</sup>。近年来研究发现,将乳糖酶添加到乳制品中生产低乳糖乳及乳制品是解决乳糖不耐受症问题的最佳途径。乳糖酶(lactase)学名 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -D-galactoside galactohdrolase, EC 3. 2. 1. 23),可将乳糖水解成葡萄糖和半乳糖,同时还具有转移半乳糖苷的作用。乳糖酶不仅可缓解乳糖不耐受症,还可改良食品和乳制品的品质、风味和口感。近几年利用其转糖苷特性生产功能性低聚半乳糖则成为另一个研究热点<sup>[3,4]</sup>。

乳糖酶广泛存在于自然界,如植物<sup>[5]</sup>、细菌<sup>[6]</sup>、丝状真菌<sup>[7,8]</sup>以及动物肠道<sup>[9]</sup>中。不同来源的乳糖酶其酶学性质也存在着较大的差异。目前商品化的乳糖酶多来源于酵母<sup>[10]</sup>和曲霉<sup>[11]</sup>的微生物发酵生产。两种来源的乳糖酶均有其不足之处,酵母来源的乳糖酶为中性酶,与牛乳的自然 pH 6.5 相近,但是酶的热稳定性差,作用温度范围窄,在 40℃ 以上就急剧失活。曲霉来源的乳糖酶具有最适温度较高、热稳定性好的特点,但作用的最适 pH 偏酸,通常在 pH 5 左右。二者均不能完全满足低乳糖乳制品的生产要求。因此从自然界中筛选具有稳定性好且作用 pH 中性等优良特性的乳糖酶才能满足低乳糖制品生产及食品工业的需要,有着良好的社会效益,而且预期也会产生巨大的经济效益。

本研究从人体的肠道中分离出一株能利用乳糖的乳杆菌(*Lactobacillus* sp.) B164,采用简并引物 PCR 和 TAIL-PCR 技术,从中克隆获得一个乳糖酶基因,将其连接到 pET-30a(+) 构建了原核表达载体,并在大肠杆菌中成功得到异源表达的重组乳糖酶,进一步对纯化的乳糖酶蛋白进行了酶学性质和牛奶水解效果的研究,以评估其用于低乳糖乳制品等食品生产领域的应用潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

乳杆菌菌株(*Lactobacillus* sp. B164)为本实验室筛选并保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*) Trans1-T1 和 T 载体 pEASY-T3 购自北京全式金生物技术有限公司。大肠杆菌 BL21(DE3) 和表达载体 pET-30a(+) 为 Novagen 公司产品。

### 1.2 酶和试剂

限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;TaqPlus DNA 聚合酶和胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;低分子量标准蛋白购自北京全式金生物技术有限公司;乳糖酶底物邻硝基苯酚- $\beta$ -D 半乳糖苷(*o*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside, *o*NPG)为 AppliChem 公司产品;组氨酸标签镍离子亲和层析柱(Ni-NTA)为 QIAGEN 公司产品;全脂纯牛奶产自北京三元乳品有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.3 产乳糖酶菌株的种属鉴定

采用以乳糖为唯一碳源的培养基筛选实验室中保存的菌株,并测定乳糖酶活性,最终筛选到一株产乳糖酶的乳杆菌菌株 B164。根据细菌的 16S rDNA 序列设计引物 16S\_27F 和 16S\_1492R(表 1)。以菌株 B164 的基因组 DNA 为模板扩增其 16S rDNA 序列,利用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,连接到 pEASY-T3 载体上,转化大肠杆菌 Trans1-T1,挑取单菌落,提取质粒并通过 PCR 鉴定重组子,挑选阳性克隆进行序列测定。测序得到的 16S rDNA 序列通过 BLAST 比对进行种属鉴定。

表 1 本研究所用引物

Fig. 1 Primers used in this study.

引物名称 Primer name	引物序列 Sequences of the primers
16S_27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
16S_1492R	5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'
42_15F	5'-GACTACWACCCNGANCANTG-3'
42_150R	5'-AACTGCCASRTNRASAAAYGA-3'
usp1	5'-GTTTATTACTATATCT-3'
usp2	5'-AAATCATATTGGCCCTC-3'
usp3	5'-TTTTAAAACTTTAATATCT-3'
dsp1	5'-AGATATTAAGTTTTTAAAA-3'
dsp2	5'-GAAGGCCAATATGATTT-3'
dsp3	5'-AGATATAGTAATAAAC-3'
hg42-164F	5'-GC GAATTCATGTACAATTTAAGT- AGAGGAAT-3'
hg42-164R	5'-AGT GCGGCCGCTTATTTAACAAG- TATTTGTACATCCC-3'

注:下划线表示酶切位点。

Note: Underlined capitals mean enzyme digestion site.

#### 1.4 乳糖酶基因 *bg42-164* 的克隆和分析

根据 GenBank 中的乳糖酶氨基酸序列的保守基序设计乳糖酶简并引物 42\_15F 和 42\_150R (表 1)。以乳杆菌 B164 的基因组 DNA 为模板,进行简并引物 PCR<sup>[12]</sup>。扩增产物连接到 pEASY-T3 载体测序后,在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上用 BLASTX 工具与 GenBank 中的序列进行相似性比对,相似性最高的基因片段确定为 B164 菌株的乳糖酶基因,命名为 *bg42-164*。根据获得的乳糖酶基因的部分序列,设计特异性引物 *usp1*、*usp2*、*usp3*、*dsp1*、*dsp2* 和 *dsp3* (表 1),以乳杆菌 B164 的基因组 DNA 为模板,使用 TAIL-PCR 方法克隆已知乳糖酶基因片段的侧翼序列<sup>[13]</sup>。使用 Vector NTI 软件进行序列装配,限制性酶切位点分析,翻译氨基酸序列并预测蛋白分子量。

#### 1.5 大肠杆菌重组表达载体的构建

根据乳糖酶基因全长序列设计表达引物 *bg42-164F* 和 *bg42-164R* (表 1)。以菌株 B164 的基因组 DNA 为模板,用 *TaqPlus* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 5 min。纯化后的 PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切并回收,与同样处理的大肠杆菌表达载体 pET-30a (+) 连接,电击转化大肠杆菌 Trans1-T1,酶切鉴定并通过测序筛选阳性克隆,命名为 pET30-164。

#### 1.6 *bg42-164* 基因在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

将 pET30-164 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3),提取质粒酶切鉴定为阳性的克隆即为乳糖酶重组表达菌株,挑取单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基(含卡那霉素)中,37℃ 摇床培养过夜。按 1% 接种量转接于 500 mL LB 液体培养基(含卡那霉素)中,37℃ 摇床培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,加入 IPTG (终浓度 0.4 mmol/L) 在 16℃ 培养 12 h 以诱导重组蛋白产生。离心收集菌体,用 Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7.4) 缓冲液重悬菌体,超声波破碎细胞,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,通过 Ni-NTA 亲和层析柱进行蛋白纯化,纯化后的蛋白进行酶活力检测及后期 SDS-PAGE 和酶学性质分析。以 pET-30a (+) 空载体

转化 BL21 (DE3) 做为阴性对照,操作方法同上。

#### 1.7 乳糖酶活性的测定<sup>[14]</sup>

*o*NPG 溶于 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 配制成 0.25% (W/V) 的底物溶液。取 200  $\mu$ L 酶液加入到 800  $\mu$ L 底物溶液中,50℃ 水浴反应 15 min 后加入 1 mL 10% TCA (三氯乙酸) 终止液,然后加入 2 mL 的 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 显色,测定波长 420 nm 时的光吸收值。酶活力单位定义:一个酶活单位 (U) 即在 pH 6.0,50℃ 条件下每分钟水解底物 *o*NPG 生成 1  $\mu$ mol *o*NP 所需的酶量。

#### 1.8 重组 BG42-164 乳糖酶的酶学性质分析

##### 1.8.1 BG42-164 的最适温度及最适 pH 的测定

在 pH 6.0, 不同温度 (25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、53℃、55℃、60℃、65℃) 条件下测定 BG42-164 的乳糖酶活力,每个处理设 3 个重复,以最高活力计为 100% 绘制最适温度曲线。

分别配制 pH 3.0~10.0 的不同 pH 的缓冲液 (pH 3.0~8.0:0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液;pH 8.0~10.0:0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液),将底物 *o*NPG 溶于不同 pH 系列缓冲液中,并将乳糖酶原液用相应的 pH 缓冲液稀释。在 50℃ 条件下测定不同 pH 下的乳糖酶活性,以最高活力计为 100%,各设 3 个重复并绘制最适 pH 曲线。

##### 1.8.2 BG42-164 的 pH 稳定性和热稳定性测定

将乳糖酶原液用不同 pH 的缓冲液稀释,37℃ 保温 60 min 后置于冰上,然后在 50℃,pH 6.0 (0.1 mol/L pH 6.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液) 条件下测定剩余的乳糖酶活力 (以未经处理的酶液活力计为 100%),计算各处理样品的剩余酶活力,绘制 pH 稳定性曲线。

在不同温度下 (47℃、50℃ 和 57℃),对 BG42-164 分别预处理 5 min、10 min、20 min 和 30 min,在 50℃,pH 6.0 条件下测定经不同温度处理后剩余的酶活力 (以未经处理的酶液活力计为 100%),各设 3 个重复,以时间为横坐标,以剩余酶活力为纵坐标绘制热稳定性曲线。

1.8.3 BG42-164 的  $K_m$  和  $V_{max}$  的测定 在 50℃,pH 6.0 条件下,用不同浓度的 *o*NPG 底物 ( $[S]$ ) 测定乳糖酶活力,计算反应速度  $v$ 。以  $1/v$  对  $1/[S]$  作图,根据双倒数方程计算  $K_m$  和  $V_{max}$ 。

### 1.9 BG42-164 水解牛奶的初步研究

将不同酶活单位的乳糖酶 BG42-164 (500 U、250 U) 分别添加到 5 mL 全脂纯牛奶中, 在 50℃、37℃ 及 18℃ 条件下保温, 间隔不同时间 (15 min、30 min、1 h、2 h、3 h、6 h 和 9 h) 取出样品, 加入 4% 氢氧化钡溶液、5% 硫酸锌溶液终止反应并去除蛋白, 13 000 r/min 离心 5 min。通过 HPLC 方法检测上清液中乳糖含量。HPLC 工作条件: 色谱仪 waters e2695, 示差折光检测器, 色谱柱为 Sugar pak I 6.5 mm × 300 mm column, 流动相为 50 mg/L 的 EDTA 钙钠盐, 流速 0.5 mL/min, 柱温 85℃。

## 2 结果与分析

### 2.1 产乳糖酶菌株的种属鉴定

将 PCR 扩增获得约 1.4 kb 的 16S rDNA 片段回收, 与 pEASY-T3 载体连接, 测序获得该菌株 16S rDNA 序列 (GenBank 登录号: JF345714)。通过 BLAST 比对分析, 与 GenBank 中乳杆菌 *Lactobacillus crispatus* (GenBank 登录号: AB597000, AB008206) 16S rDNA 相似性为 100%, 因此将菌株 B164 鉴定为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)。

### 2.2 bg42-164 基因的克隆及分析

采用简并引物 PCR 和 TAIL-PCR 的方法, 获得乳糖酶基因, 命名为 *bg42-164* (GenBank 登录号: JF345715)。该基因全长 2 031 bp, (G + C)% 含量为 36.3%, 编码 676 个氨基酸和一个终止密码子, 预测蛋白分子量为 77 kDa, 等电点为 pH 6.01, SingalP 预测无信号肽序列。通过与 GenBank 中的序列进行比对发现, *bg42-164* 的氨基酸序列与已报道的 *Lactobacillus crispatus* JV-V01 (GenBank 登录号: ZP\_03996880) 和 *Lactobacillus crispatus* 125-2-CHN (GenBank 登录号: ZP\_05549020) 的乳糖酶序列相似性分别为 99% 和 97%, 且均属于糖基水解酶第 42 家族<sup>[15]</sup>。

### 2.3 bg42-164 基因在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

将扩增得到的约 2 kb 的目的片段通过双酶切后连接到载体 pET-30a(+), 得到 *bg42-164* 大肠杆菌重组表达载体 pET30-164。pET30-164 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 重组菌株经 IPTG 诱导

后, 培养基上清中没有检测到乳糖酶活力; 在超声破碎上清中, 乳糖酶活力为 4.18 U/mL; 在超声破碎沉淀中, 乳糖酶活力为 0.59 U/mL。进一步通过 SDS-PAGE 分析 (图 1), 结果显示重组蛋白主要以可溶性方式在大肠杆菌细胞内得到表达。胞内蛋白经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化, 在 NTA-20 (Tris-HCl, 20 mmol/L, pH 7.4, 含 20 mmol/L 咪唑) 洗脱液中得到单一蛋白单带 (图 1 箭头所示), 蛋白分子量约 76 kDa, 与预测蛋白分子量相符。

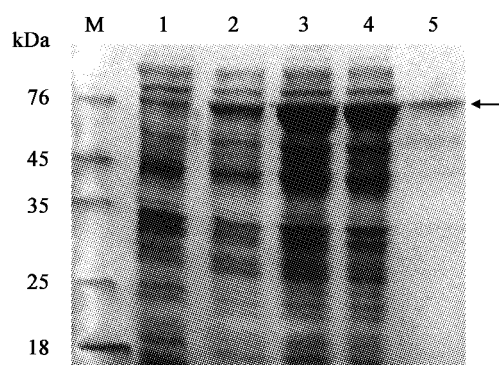


图 1 重组乳糖酶 BG42-164 诱导表达及纯化 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of BG42-164 protein's induction and purification.

M: 低分子量标准蛋白; 1: 含空载体 pET30a (+) 大肠杆菌经 IPTG 诱导的全细胞裂解液; 2: 含重组质粒 pET30-164 大肠杆菌未经 IPTG 诱导的全细胞裂解液; 3: 含重组质粒 pET30-164 大肠杆菌经 IPTG 诱导的全细胞裂解液; 4: 经 IPTG 诱导, 含重组质粒 pET30-164 的大肠杆菌超声破碎后离心上清液; 5: 上清液经 NTA-20 洗脱收集液, 箭头所示为目的蛋白。

M: Low molecular weight protein marker; 1: *E. coli* cells lysates containing pET-30a (+) induced by IPTG; 2: *E. coli* cells lysates containing pET30-164 without IPTG induction; 3: *E. coli* cells lysates containing pET30-164 induced by IPTG; 4: Ultrasonic supernatant of *E. coli* cells lysates containing pET30-164 induced by IPTG; 5: Fraction of supernatant purified with NTA-20 buffer, the arrow shows target protein.

### 2.4 重组 BG42-164 乳糖酶的酶学性质分析

**2.4.1 BG42-164 的最适温度和最适 pH** BG42-164 在 50℃ 条件下, 相对酶活力最高 (图 2-A)。在 40 ~ 55℃ 之间相对酶活均在 65% 以上。在 pH 6.0 时, BG42-164 的酶活力最高, 并且在 pH 5.6 ~ 7.0 之间该酶能够保持 75% 以上的酶活性 (图 2-B), 表明 BG42-164 属于中性乳糖酶, 这与天然牛乳的 pH 6.5 相近。

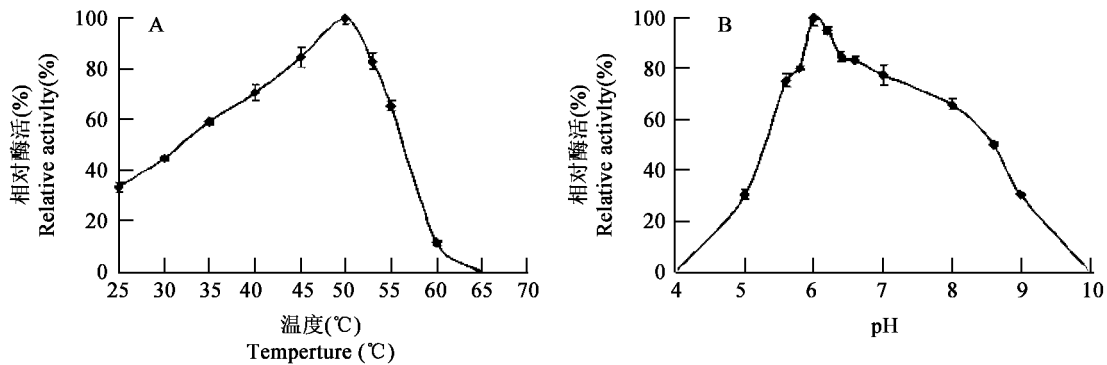


图2 乳糖酶 BG42-164 的最适温度和最适 pH

Fig.2 Optimal temperature and pH of the lactase BG42-164.

A:最适温度曲线; B:最适 pH 曲线. 图中数值为三次重复的均值  $\pm$  标准差

A; Effects of temperature on enzyme activity; B; Effects of pH on enzyme activity. The values were means of three replicates  $\pm$  standard deviation.

**2.4.2 BG42-164 的热稳定性和 pH 稳定性** 经不同温度热处理后,发现该酶在 47°C 处理 30 min,仍能保留 89% 以上酶活;50°C 处理 30 min,酶活保留仍在 83% 以上。在 57°C 下,随处理时间延长,酶活逐渐下降,20 min 后剩余酶活为 39% (图 3-A)。在 pH 6.6 ~ 9.0 范围内处理酶液 60 min,剩余酶活均保持在 70% 以上(图 3-B)。结果表明,BG42-164 乳糖酶有较好的热稳定性和 pH 稳定性,能够适应常规乳品加工的 pH 环境和热处理。

**2.4.3 BG42-164 的  $K_m$  和  $V_{max}$**  利用米氏方程的双倒数法作图,得出线性回归公式  $1/v = 0.185 \times 1/[S] + 0.052$  ( $R^2 = 0.998$ ),并据此公式计算出 BG42-164 的  $K_m$  为 3.559 mmol/L,  $V_{max}$  为 19.231  $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$ 。

## 2.5 乳糖酶水解牛奶的初步研究

通过 HPLC 方法,测定不同条件下乳糖酶 BG42-164 对牛奶的水解结果表明(表 2),不同酶量对牛奶中的乳糖水解程度不同,在相同温度和时间条件下,乳糖酶添加量 500 U 组的乳糖水解率均高于使用乳糖酶添加量 250 U 组。在同一时间内随着温度的升高,乳糖水解率逐渐增加。在不同的温度区间,该酶均能有效水解牛奶中的乳糖。50°C 处理 2 h,牛奶中的乳糖全部水解,水解率达到 100%;37°C 处理 6 h,乳糖水解率都能达到 99% 以上;即便是在 18°C 下水解 9 h,乳糖水解率也能达到 60%。由此可见,该酶具有较宽的温度作用范围和较好的水解效果,为该酶在低乳糖奶生产中应用提供了理论依据。

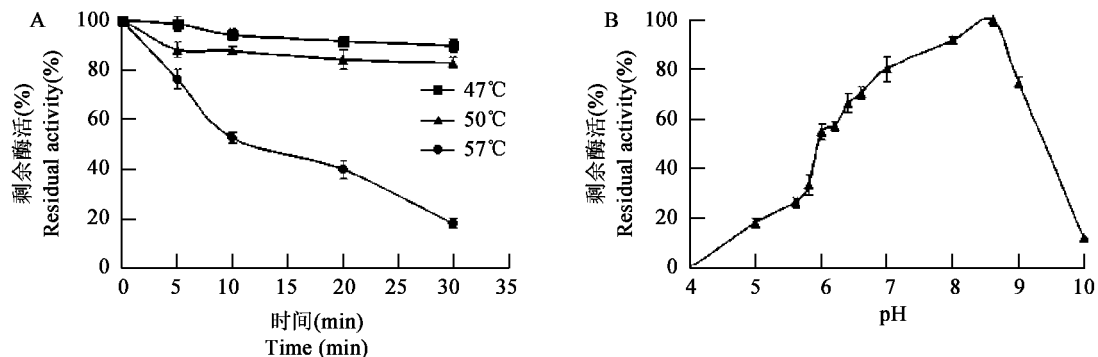


图3 乳糖酶 BG42-164 的热稳定性和 pH 稳定性

Fig.3 Thermal stability and pH stability of the lactase BG42-164.

A:热稳定性曲线; B:pH 稳定性曲线. 图中数值为三次重复的均值  $\pm$  标准差

A; Thermal stability of the enzyme; B; pH stability of the enzyme. The values were means of three replicates  $\pm$  standard deviation.

表 2 BG42-164 对牛奶乳糖的水解率  
Table 2 Hydrolysis rate of milk lactose with BG42-164.

处理 Treatment	乳糖水解率(%) Lactose hydrolysis rate(%)	
50℃ (500U)	15 min	48.69
	30 min	79.56
	1 h	100
50℃ (250U)	15 min	36.01
	30 min	47.15
	1 h	75.62
	2 h	100
37℃ (500U)	3 h	76.84
	6 h	99.52
	9 h	100
37℃ (250U)	3 h	74.12
	6 h	95.31
	9 h	99.45
18℃ (500U)	3 h	48.69
	6 h	62.66
	9 h	74.14
18℃ (250U)	3 h	44.12
	6 h	59.78
	9 h	64.94

### 3 讨论

菌株乳杆菌 B164 来源于人体胃肠道。乳杆菌是人体胃肠道内正常微生物体系中的重要成员,其能够通过重建肠道菌群平衡,抑制有害微生物的生长,从而有利于人类提高健康状态。该类菌株具有安全性高,无毒无害的特点,是常见的微生态制剂并用于生产酸奶等乳制品。近几十年来国内外对乳杆菌已开展了广泛的菌种筛选,代谢调控及基因组学等方面的研究<sup>[16]</sup>。

乳杆菌来源的乳糖酶虽然具有优良的水解乳糖及生产低聚半乳糖的性质,但其在原始菌株内蛋白表达量普遍偏低,难于获得大量蛋白且纯化困难<sup>[17]</sup>,不利于大规模生产和使用。因此,有必要将乳糖酶基因转入基因工程菌中进行异源表达以获得能够用于大规模生产的菌株。大肠杆菌表达系统是目前了解最深入,应用最为广泛的原核表达系统,是分子生物学研究和生物技术产业发展过程中的重要工具。本试验选用的 pET 系列载体和大肠杆菌 BL21 (DE3) 是目前大肠杆菌中应用最为广泛的表达系统之一。将乳糖酶基因

*bg42-164* 连入 pET-30a(+) 表达载体并转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后,该基因可以在大肠杆菌中进行活性表达,比原始菌株乳糖酶酶活提高 10 倍以上,而且还有进一步提高的潜力,有利于大规模生产。此外也尝试将乳糖酶基因 *bg42-164* 在毕赤酵母中进行异源表达,但重组蛋白未能分泌至培养基上清中。外源基因在毕赤酵母中的表达和分泌受到多种因素的影响,如分泌信号、外源基因序列特点、蛋白聚合度和糖基化修饰等<sup>[18,19]</sup>。不同的外源基因在毕赤酵母中的表达有各自的特点,甚至有些蛋白不能进行活性表达,或者表达后分泌量很低。对于乳糖酶基因 *bg42-164*,其在毕赤酵母中未能分泌的原因仍有待于进一步的实验验证。

采用最适温度高且热稳定性好的酶,在较高的作用温度下就可以很好地抑制生产过程中微生物的污染,而且水解作用可与巴氏杀菌同时进行或伴随冷却阶段保温水解,简化了工艺流程,因此乳糖酶的热稳定性是评估其应用性能的重要指标。目前应用于乳品及其他食品工业生产的乳糖酶大多来源于酵母和曲霉微生物,酵母来源乳糖酶的最适作用温度通常在 37℃ 左右,也是最容易滋生杂菌的温度<sup>[20]</sup>。尤其克鲁维酵母来源的乳糖酶的热稳定性较差,当温度达到 40℃ 以上时酶活就急剧下降<sup>[21]</sup>。本研究中的乳糖酶热稳定性较好,50℃ 处理 30 min 后,剩余酶活仍在 83% 以上,在一定程度上改善了食品用乳糖酶热稳定性差的问题。曲霉属来源的乳糖酶虽然热稳定性较好,但作用的最适 pH 偏酸<sup>[22]</sup>,在牛奶正常 pH 6.5 的情况下不能很好的发挥水解作用。乳糖酶 BG42-164 的最适 pH 为 6.0,且在 pH 5.6 ~ 7.0 之间仍能够保持较高活性,适用于牛乳和乳清中水解乳糖酶。另外,乳糖酶基因 *bg42-164* 来源菌株乳杆菌 B164 是一株来源于人体胃肠道的乳杆菌,其安全性和有效性具有充分保证。因此乳糖酶 BG42-164 用于水解牛奶或生产低乳糖乳制品安全可靠,其在低乳糖奶制品生产和乳品加工生产中将具有可观的市场应用潜力。

### 参 考 文 献

- [1] 何梅. 乳糖酶缺乏和乳糖不耐受[J]. 国外医学(卫生学分册), 1999, 26(6): 339 - 342.

- [2] Savaiano D, Levitt M. Milk intolerance and microbe-containing dairy foods[J]. *J. Dairy Sci.*, 1987, 70(2):397-406.
- [3] Iqbal S, Nguyen T H, Nguyen T T, et al. Beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides[J]. *Carbohydr. Res.*, 2010, 345(10):1408-1416.
- [4] 刘建福,王璋,许时婴. 影响 *Kluyveromyces fragilis*  $\beta$ -D-半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖的因素[J]. 南昌大学学报, 2004, 26(1):76-100.
- [5] Lee D, Kang S, Suh S, et al. Purification and characterization of a beta-galactosidase from peach (*Prunus persica*) [J]. *Mol. Cells*, 2003, 15(1):68-74.
- [6] 段文娟,杨娇艳,李卓夫,等. 源于嗜热古细菌 *Pyrococcus furiosus* 乳糖酶基因的原核表达及酶学性质分析[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(2):76-81.
- [7] Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, et al. Beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme[J]. *Protein Expr. Purif.*, 2001, 21(1):24-29.
- [8] 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.
- [9] Yoon J H, Ajisaka K. The synthesis of galactopyranosyl derivatives with beta-galactosidases of different origins [J]. *Carbohydr. Res.*, 1996, 292:153-163.
- [10] Rubio-Teixeira M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes [J]. *Biotechnol. Adv.*, 2006, 24(2):212-225.
- [11] 袁绍鹏,肖敏,孙正,等. 一株曲霉 (*Aspergillus* sp. AF)  $\beta$ -半乳糖苷酶的转糖基活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(11):31-34.
- [12] 王洪振,周晓霞,宋朝霞,等. 简并 PCR 技术及其在基因克隆中的应用[J]. 遗传, 2003, 25(2):201-204.
- [13] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. *Genomics*, 1995, 25(3):674-681.
- [14] Park Y K, De Santi M S S, Pastore G M. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus Oryzae* [J]. *J. Food Sci.*, 1979, 44(1):100-103.
- [15] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities [J]. *Biochem. J.*, 1993, 293(3):781-788.
- [16] 刘畅,郭晓奎. 乳酸菌基因组学研究进展[J]. 中国微生物生态学杂志, 2006, 18(04):328-330.
- [17] 杨桂连,秦守涛,刘琼,等. 乳酸菌胞外蛋白水解酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 食品科学, 2010, 31(21):254-257.
- [18] Kochetov A, Ponomarenko M, Frolov A, et al. Prediction of eukaryotic mRNA translational properties[J]. *Bioinformatics*, 1999, 15(7):704-712.
- [19] Wu B, Cha L, Du Z, et al. Construction of mathematical model for high-level expression of foreign genes in pPIC9 vector and its verification[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 354(2):498-504.
- [20] 王敏,檀建新,张伟,等. 微生物乳糖酶的特性和发展现状[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26:167-169.
- [21] Zhou Q Z K, Chen X D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* [J]. *Biochem. Eng. J.*, 2001, 9(1):33-40.
- [22] 王静,贾英民. 黑曲霉乳糖酶固定化前后酶学性质比较研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2):904-905, 909.