

唾液乳杆菌 XH4B 的 α -半乳糖苷酶纯化及性质研究

杜新永, 刘同杰, 高世阳, 何国庆

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江省食品微生物技术重点实验室, 浙江杭州 310058)

摘要: 本研究通过超滤、Sephadex G200 凝胶过滤层析纯化来源于唾液乳杆菌 XH4B (GeneBank 索引号: JX125456) 的 α -半乳糖苷酶, 并对其酶学性质进行了研究。结果表明, 超滤时采用 100 kDa 的滤膜, 分子量大于 100 kDa 的组分有酶活。利用 Sephadex G200 进行柱层析洗脱至 370~400 min 时得到的组分表现出明显的 α -半乳糖苷酶活力。SDS-PAGE 电泳结果表明, 该酶的蛋白质单体分子量为 70~80 kDa, 未变性的酶蛋白应为多聚体, 总分子量大于 100 kDa。利用酶比活力计算的结果, 相对于粗酶, 超滤纯化效率为 149.80%, 柱层析纯化效率为 391.91%。经响应面优化, 确定唾液乳杆菌 XH4B 来源的 α -半乳糖苷酶最佳酶促反应条件为: 柠檬酸缓冲液 pH 值 5.5, 离子强度 0.15 mol/L, 反应温度 52 °C。该酶对 pNPG 的 K_m 值为 0.817。相对于纯水, 各类金属离子中, 仅有 K^+ 和 Na^+ 对酶活力有正向的激活作用, 酶活力分别达到了 102.50% 和 104.18%。EDTA (96.54%), Mg^{2+} (91.53%), Ca^{2+} (82.51%), 以及 DTT (79.38%) 能够较大限度保留酶活力, 而 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Vc 则显著阻碍了酶促活力, 仅能保留 5~7%。

关键词: 乳酸菌; 唾液乳杆菌; α -半乳糖苷酶; 超滤; 凝胶过滤; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2014)1-137-142

Purification and Catalyst Kinetics of α -galactosidase Derived from *Lactobacillus salivarius* XH4B

DU Xin-yong, LIU Tong-jie, GAO Shi-yang, HE Guo-qing

(Biosystem Engineering and Food Science of Zhejiang University, Zhejiang provincial Key laboratory of Food Microbiology, Hangzhou 310058, China)

Abstract: In this study, α -galactosidase was derived from *Lactobacillus salivarius* XH4B (GeneBank accession number: JX125456), and purified by super filtration and size exclusive chromatography of Sephadex G200. The results showed that the compounds with molecular weight (M_w) more than 100 kDa had enzymatic activity and those washing constituents of 370~400 min showed significant activity. The SDS-PAGE appeared that the M_w of the monomer of the enzyme was 70~80 kDa, while the native enzyme was a polymer with a M_w exceeded 100 kDa. Compared with the crude enzyme, the purification efficiencies of super filtration and column chromatography were 149.80% and 391.91%, respectively. The optimal catalyst conditions determined by responding surface method were citric buffer pH 5.5, ion strength 0.15 mol/L and reaction temperature 52 °C. The K_m value of the enzyme to pNPG was 0.817. Compared to pure water system, only K^+ and Na^+ could improve the catalyst activity to 102.50% and 104.18% respectively. EDTA (96.54%), Mg^{2+} (91.53%), Ca^{2+} (82.51%), and DTT (79.38%) could reserve most of the activity, while Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} and Vc could only remain 5~7% activity.

Key words: lactic acid bacteria; *Lactobacillus salivarius*; α -galactosidase; super filtration; size exclusive chromatography; catalyst kinetics

α -半乳糖苷酶 (α -galactosidase, EC 3.2.1.22) 属外切糖苷酶类, 特异性水解半乳糖类寡糖和多聚半乳一(葡)甘露聚糖的非还原性末端 α -1,6-半乳糖苷键, 又称为 α -D-半乳糖苷水解酶 (α -D-galactoside galactohyase)、 α -半乳糖苷酶 A (α -galactosidase A)、

收稿日期: 2013-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31130042); 十二五国家科技支撑计划项目 (2012BAD37B01)

作者简介: 杜新永 (1973-), 男, 博士研究生, 研究方向: 乳酸菌应用

通讯作者: 何国庆 (1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物,

功能食品

半乳糖苷水解酶 (α -galactoside galactohydrolase)、蜜二糖酶 (melibiase)。 α -半乳糖苷酶广泛存在于大豆^[1]、蔬菜^[2]、丝状真菌^[3]、酵母^[4]以及乳酸菌中。

乳杆菌 (*Lactobacilli*) 是报道最多的具有 α -半乳糖苷酶活性的乳酸菌种类。早在 1973 年, Mital 就从几种乳杆菌的提取液中检测到了 α -半乳糖苷酶的活性^[5]。这些乳杆菌的种类有: 发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、短乳杆菌 (*L. brevis*)、布氏乳杆菌 (*L. buchneri*)、纤维素乳杆菌 (*L. cellobiosus*) 和唾液乳杆菌 (*L. salivarius*)。之后的学者对于乳杆菌产 α -半乳糖苷酶进行了深入的研究。1996 年 Garro 报道了发酵

乳杆菌 (*L. fermentum*) 能够水解大豆中含有半乳糖苷键的寡糖, 包括蜜二糖、棉子糖、水苏糖等^[6], 陆续的相关报道证明发酵乳杆菌等乳杆菌具有 α -半乳糖苷酶活性^[7-8]。在双歧杆菌方面, 1999 年 Leder 等报道了青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) DSM20083 具有 α -半乳糖苷酶活性^[9], 陆续又有一些其他方面的报告, 证明短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)^[10], 两歧双歧杆菌 (*Bifido bacterium bifidum*)^[11]的某些菌株也有 α -半乳糖苷酶活力。另外, 两歧双歧杆菌 (NCIMB 41171) 的 DNA 文库在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) RA11r (melA(-)B(+)) 中获得重组表达, 并且分离到了一个 α -半乳糖苷酶的基因^[11]。

除了上述两个属的乳酸菌产 α -半乳糖苷酶之外, 还有乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)^[12]、明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)^[13]等均有 α -半乳糖苷酶活性的报道。

本研究中采用的唾液乳杆菌 XH4B (GeneBank 索引号: JX125456) 为本实验筛选的, 具有较好 α -半乳糖苷酶活性的乳酸菌, 本文通过超声波法提取成熟细胞的粗酶, 采用超滤、凝胶过滤等手段进行纯化得到纯酶; 并且还还对 α -半乳糖苷酶的催化条件、Km 值, 以及金属离子对催化活力等方面的影响进行了报道。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种准备: 唾液乳杆菌 XH4B 由本实验室分离并保存。

Sephadex G200 (葡聚糖凝胶, pharmacia 进口分装); pNPG (阿拉丁, aladdin); 蛋白检测 Bradford 试剂盒 (SK3031, 上海生工); 蛋白检测 Marker (Fermentas, SM0431); 培养基 (蛋白胨、酵母粉等均为 OXOID); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

厌氧培养箱: 上海青苗 YQX-II 型; 超滤器: MILLIPORE COGENT; 柱层析工作站: 上海伍豪 WH500; 离心机: Eppendorf 5417R; 冻干机: LABCONCO 117; 电泳设备: Bio-rad; 分光光度计: 北京普析通用。

1.3 α -半乳糖苷酶的制备

采用 250 mL 三角瓶, 内装 100 mL 改良 PY-St 培养基 (酪蛋白胨 5 g, 胰蛋白胨 5 g, 酵母粉 10 g, 无水乙酸钠 20 g, 磷酸氢二钾 6 g, 七水硫酸镁 0.2 g,

硫酸锰 0.03 g, 水苏糖 (Stachyose) 15 g, 去离子水 1000 mL, pH6.78), 接种量 2%, 37 °C, 厌氧培养 3 d, 10000 r/min 离心后, 弃去上清液, 柠檬酸缓冲液洗涤 1 次, 超声波 (20 Kc, 冰水浴) 破碎细胞后, 弃去沉淀, 上清液冻干后, 即得粗酶。粗酶经超滤 (100 kDa) 后得到超滤纯化酶, 可用于柱层析纯化, 并进行相应的酶学性质研究。

1.3.1 酶活力测定

100 μ L 酶样品稀释合适的倍数 (10X 或 100 X, 使反应体系的吸光度值在标准曲线范围内) 后, 加 100 μ L 柠檬酸缓冲液 (pH 5.5, 离子强度 0.15 mol/L, 在单因素实验中分别使用相应的 pH 值或离子强度值), 再加入 50 μ L 5 mmol/L 的 pNPG 混合, 在 52 °C 水浴中反应 10 min-反应温度单因素实验时, 按相应的温度值进行反应。终止反应使用 0.25 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液 1000 μ L, 显色稳定后, 测定 400 nm 吸光度值, 以 p-硝基酚的生成量表示酶活力值^[9]。

酶活力 (U/mL) 的定义为: 在特定的酶促反应条件下, 每分钟释放 1 μ mol 的 p-硝基酚所需的酶量。

1.3.2 蛋白质检测

采用上海生工生物的 Bradford 试剂盒 (SK3031), 根据操作指南测定标准曲线, 样品测定时, 取 200 μ L 样品加 1 mL Bradford 试剂, 反应 5 min 后测定 595 nm 吸光度值, 并计算出相应的蛋白质含量 (μ g)。

1.3.3 纯化酶蛋白

Sephadax G200 凝胶充分溶胀后装柱, 预先用洗脱缓冲液 (柠檬酸缓冲液, pH 5.5, 0.15 mol/L) 平衡柱子至基线平稳后, 用 5 mL 缓冲液溶解 30 mg 粗酶, 上样后开始记录洗脱液的 OD_{280nm} 值的变化。洗脱液流速 0.2 mL/min, 收集器设定时间为 10 min/管, 有蛋白质波峰出现的试管要进行 α -半乳糖苷酶活性检测, 并根据酶比活力 (每克蛋白质的酶活力单位: U/ μ g pro) 计算纯化效率。

1.3.4 SDS-PAGE 电泳检测酶蛋白

用于 SDS-PAGE 电泳的蛋白样品调整其浓度为 1.0 mg/mL 左右, 浓度偏低时, 上样量需适度增大, 样品溶解液中包含 2% 的 SDS 和 5% 的巯基乙醇, 上样前 95 °C 水浴 3 min 防止蛋白聚合, 10000 g 离心 2 min 后即可上样。上样量为 10~20 μ L。电泳时电压稳定在 60 V, 直到溴酚蓝前端泳动至电泳胶板下缘 1 cm 处停止。SDS-PAGE 胶经固定、染色、脱色后, 用扫描仪记录电泳结果。

1.3.5 最佳酶促条件确定

选取缓冲液 pH 值 (4.5~9.0)、离子强度 (0.05~3.0 mol/L)、酶促反应温度 (40~60 °C) 三因素分别进行

单因素实验, 确定最佳酶促反应条件的范围, 再利用 Design Expert 8.0 设计响应面优化试验。检测响应值为酶活力 (U/mL), 实验数 20, 分析模型为立方体 (Cubic)。上述三因素两两配对分析, 最终确定最佳酶促反应条件。

1.3.6 Km 值测定

在 1.3.2 中用于 α -半乳糖苷酶活力检测的 pNPG 浓度为 10 mmol/L, 用倍量稀释法, 共稀释 10 个梯度, 按 1.3.2 的方法进行酶活力检测, 以底物浓度的倒数为横坐标 ($1/[S]$, ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)⁻¹), 底物分解速率的倒数 ($1/v$, $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$) 为纵坐标绘制散点图, 并计算线性趋势线方程, 斜率与常数项的比值即为 Km 值。

1.3.7 金属离子对酶活力的影响

配制 10 mmol/L 的 Vc、DTT、EDTA, 以及 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、Fe³⁺、Fe²⁺ 的溶液作为酶促反应的缓冲液, 用纯水配制适当浓度的酶溶液后, 用上述溶液连续 10 倍量连续稀释两次 (稀释 100 倍) 后, 再用 1.3.2 的方法测定酶活力值, 最终以纯水测定的酶活力值为基准, 计算金属离子及 Vc 等对唾液乳杆菌来源的 α -半乳糖苷酶活力的影响。

1.4 统计分析

本研究所有数据均为 3 个重复样品的平均值, 用 SPSS 16.0 进行显著差异性分析, Design Expert 8.0 进行响应面的设计与分析, 数据计算、绘图等采用 Microsoft Excel 2010。

2 结果与分析

2.1 α -半乳糖苷酶的纯化及回收率

表 1 Sephadex G200 柱层析参数表

Table 1 Parameters of Sephadex G200 Column

Chromatography			
项目	参数	项目	参数
凝胶	Sephedax G200	层析柱	16×100mm (200 mL)
上样量	30 mg	洗脱液	柠檬酸缓冲液
上样体积	5 mL		(pH 5.5, 0.15 mol/L)
柱体积(CBV)	100 mL	洗脱体积	2 CBV
流速	0.2 mL/min	收集频率	10 min/管

唾液乳杆菌 XH4B 培养液离心 (10000 g, 5 min) 后弃去上清液, 缓冲液洗涤两次后, 超声破碎, 收集上清液即为粗酶。粗酶经超滤 (100 kDa 滤膜) 后, 酶活检测结果显示 α -半乳糖苷酶存在于分子量大于 100 kDa 的组分中, 收集有酶活的组分并冻干, 即为超滤酶。取 30 mg 超滤酶, 采用 Sephadex G200 凝胶

进行柱层析 (具体参数见表 1), 检测器记录 OD_{280nm} 值, 纯化结果如图 1 所示。

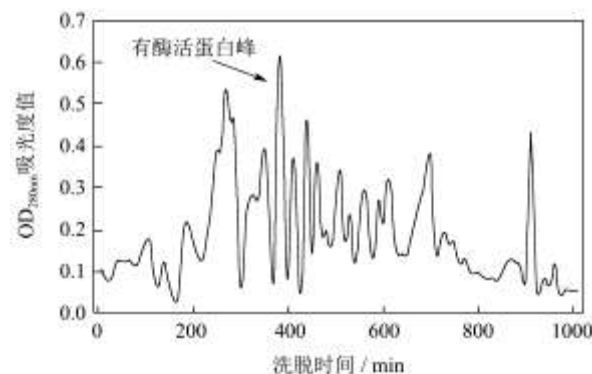


图 1 Sephadex G200 纯化 α -半乳糖苷酶效果图

Fig.1 Purification of α -galactosidase by Sephadex G200

图 1 可见, 上样后洗脱 1000 min, 获得了较多的蛋白峰, 分别取 OD_{280nm} 值大于 0.3 的洗脱组分进行 α -半乳糖苷酶活性测定, 结果显示, 洗脱时间 370~400 min 时得到的组分表现出明显的 α -半乳糖苷酶活力。其余的蛋白峰组分均未检测出 α -半乳糖苷酶的活力。根据蛋白峰面积进行估计, Sephadex G200 的纯化效果约在 10 倍以上。

分别测定粗酶、超滤酶、柱层析纯化酶的蛋白质浓度、酶活力, 计算各自的酶比活性, 以酶比活性为基准, 换算出不同纯化手段获得的 α -半乳糖苷酶的纯度 (表 2)。粗酶中蛋白质组较为复杂, 经超滤后, 纯度可达到 149.80%, 说明除去了一部分小分子量的蛋白质, 操作过程中, 酶失活现象较小。凝胶过滤柱层析时, 上样量为 5 mL, 洗脱结束后总体积达到 200 mL, 而且操作时间超过了 16 h, 酶失活现象较为严重, 因此酶比活性计算的纯化倍率, 相对于粗酶, 仅为 391.91%, 相对于超滤酶, 则为 261.63%。与图 1 中杂蛋白峰数远超过单一酶蛋白峰相比, 纯化倍率的计算结果偏低。分析原因, 可能是 α -半乳糖苷酶的酶活力在柱层析过程中有较大程度的损失。

与真菌来源的 α -半乳糖苷酶相比, 乳酸菌来源的 α -半乳糖苷酶得率较低, 且分离困难, 因为丝状真菌的酶分泌到发酵液中, 能够直接进行提取、纯化。Ozsoy 等从曲霉 (*Aspergillus flavipe*) 中分离到 α -半乳糖苷酶, 并利用 DEAE 离子交换柱层析, 结果显示, 粗酶、纯化酶的酶活力分别是 4629.0 U/mL 和 762.9 U/mL, 而酶比活力仅为 0.105 U/ μg Pro 和 3.179 U/ μg Pro^[3]。本实验中, 最高酶活力为超滤酶, 可以达到 5.25 U/mL, 酶比活力为 3.69 U/ μg Pro, 而柱层析纯化酶的比活力可以达到 7.06 U/ μg Pro (表 2)。Bae 等采用唾液乳杆菌 Nam27 提取 α -半乳糖苷酶, 并采用 DEAE Sephadex G50 和 Mono Q 进行柱层析后, 纯化酶的酶

比活力可以达到 8.99 U/ $\mu\text{g Pro}^{[4]}$, 高于本研究的结论。分析其原因, 可能是两次柱层析纯化效果优于本研究的单次纯化的缘故。采用乳酸菌来源的 α -半乳糖苷酶, 其优势在于安全性高, 且全菌可以作为益生菌加入到发酵日的物, 如豆粕等里面去。与此同时, 乳酸菌作为益生菌, 还有抑制病原菌生长、刺激宿主免疫力等效果, 具有较广阔的应用前景。

表 2 α -半乳糖苷酶的纯化倍率表

Table 2 Purification effect rate of α -galactosidase

项目	粗酶	超滤	柱层析
蛋白质浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	2.48	1.94	0.52
酶活力/ (U/mL)	4.46	5.25	3.69
比活力/ $(\text{U}/\mu\text{g pro})$	1.80	2.70	7.06
纯化倍率/%	100	149.80	391.91

2.2 不同纯度半乳糖苷酶电泳效果

分别取不同来源的 α -半乳糖苷酶进行 SDS-PAGE 电泳, 结果见图 2。其中, Ur 代表 4M 脲溶液提取的粗酶 (得率较高, 酶蛋白无活性), Cr 代表用超声法获得的粗酶, Sf 代表用超滤法纯化得到的酶, 而 Sc 则代表采用 Sephadex G200 纯化后得到的酶。

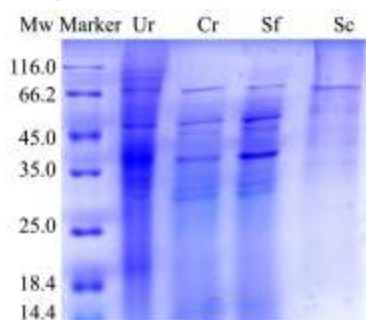


图 2 不同来源 α -半乳糖苷酶电泳图

Fig.2 SDS-PAGE of different sources of α -galactosidase

从图 2 中可以看出, 柱层析后得到的蛋白条带集中于 45 kDa 以上, 因为 Sephadex G200 属于尺寸排阻层析, 通过蛋白质分子量的大小进行分离, 根据 Goulas 的报道, 乳杆菌来源的 α -半乳糖苷酶为四聚体, 酶蛋白分子量约为 243 kDa, 并且有一个 85 kDa 的亚基^[11]。图 2 中的 Sc 泳道上, 处于最上端的清晰条带是 α -半乳糖苷酶在 SDS 处理下, 变性的蛋白质单体, 其余较为模糊的条带, 可能是杂蛋白, 也有可能是 α -半乳糖苷酶四聚体解聚之后其他的单体。

实验结果 2.1 Sephadex G200 柱层析收集的洗脱液, 通过酶活力检定法确定 α -半乳糖苷酶的所在, 而 SDS-PAGE 电泳并未得到单一条带, 因此, 不能进一步判断 α -半乳糖苷酶的分子量, 但是在其他处理的酶对应的泳道 (Ur、Cr、Sf) 中, 均有与 Sc 泳道最上端

条带对应的条带, 结合上述文献报道, 可以推测: 在 α -半乳糖苷酶变性解聚之后, 最主要的蛋白酶单体的分子量约为 70~80 kDa。

2.3 最佳酶促反应条件

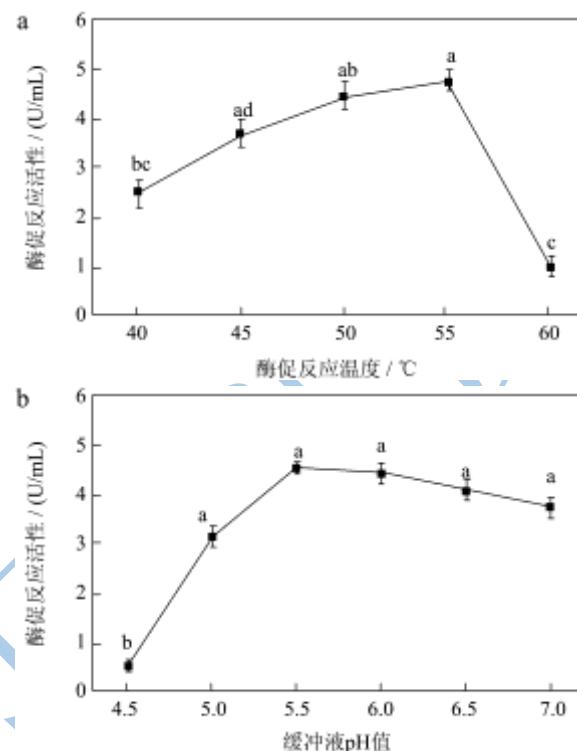


图 3 不同反应温度及 pH 值的酶促活性

Fig3 Catalyst activity with various temperature and pH value

注: 图中 a、b 代表差异显著性 ($P < 0.05$)

试验结果表明, 酶促反应温度及缓冲液的 pH 值对于 α -半乳糖苷酶活性有着较显著的影响。其中, 反应温度从 40 °C (菌种 XH4B 培养温度为 37 °C) 开始, 随着温度的上升, 酶促反应活力逐渐上升 (图 3A), 超过 55 °C 之后, 迅速下降。当反应温度为 60 °C 时, 酶活力损失严重。对于缓冲液 pH 值, 由图 3B 可以看出, 当 pH 低于 4.5 时, 基本检测不到酶活力, 随着 pH 超过 5.0 之后, 酶活力则稳定于一个较高的水平。至 pH 7.0 之后, 酶活力开始有所下降, 但下降幅度不大, 继续升高到 pH 8.0~9.0, 仍能检测到较明显的酶活力。

根据报道, 乳酸菌来源的 α -半乳糖苷酶最佳催化反应条件一般在 50~55 °C, pH 5.5~6.0。随着温度的提高, 发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) CRL722 在 50 °C 时, 30 min 会丧失所有酶活性^[15], 但是短双歧杆菌 (*B. breve*) 却能在 50 °C 保持活性^[10], 40 °C 时, 卷曲乳杆菌 (*L. crispatus*) 可以保持活性 1 h^[13]。

为进一步确定唾液乳杆菌 XH4B 来源的 α -半乳糖苷酶最适宜的酶促反应条件, 设定反应温度范围为

45~55 °C, pH 范围为 5.5~6.5, 缓冲液离子强度 0.05~0.15 mol/L, 以 α-半乳糖苷酶活力为响应值, 利用 Design Expert 设定三因素、单响应值的 20 轮实验, 考察酶促反应的最佳条件, 结果如图 4 所示。

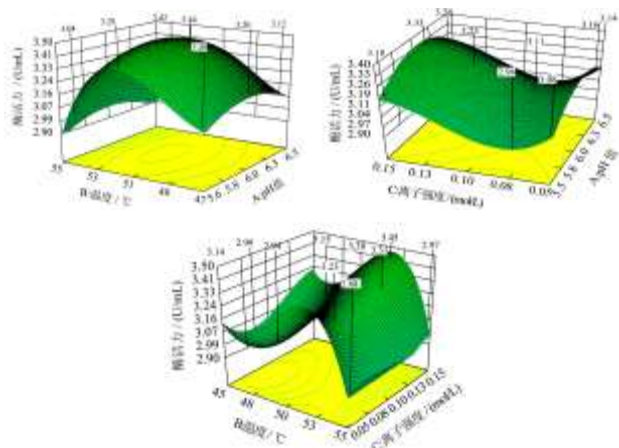


图 4 响应面法优化 α-半乳糖苷酶促反应条件

Fig.4 Optimization of catalyst conditions by Respond Surface

Method

最佳酶促反应条件的响应面试验采用立方体模型进行分析, ANOVA 计算结果的 $P < 0.001$, 实验结果具有较好的显著性。从图 4 中可以直观地看出, 当反应温度在 52 °C 时, 酶促反应活力最高, 而 pH 值在 5.5~6.5 的范围内, 酶促反应活力变化并不明显。本研究同时考察了缓冲液不同离子强度对酶促反应活力, 在柠檬酸缓冲液 0.05~0.15 mol/L 的范围内对酶促活力影响不大。综合各项指标, 最终确定唾液乳杆菌 XH4B 来源的 α-半乳糖苷酶最佳酶促反应条件为: 柠檬酸缓冲液 pH 值 5.5, 离子强度 0.15 mol/L, 反应温度 52 °C。

2.4 以 pNPG 为底物的 Km 值

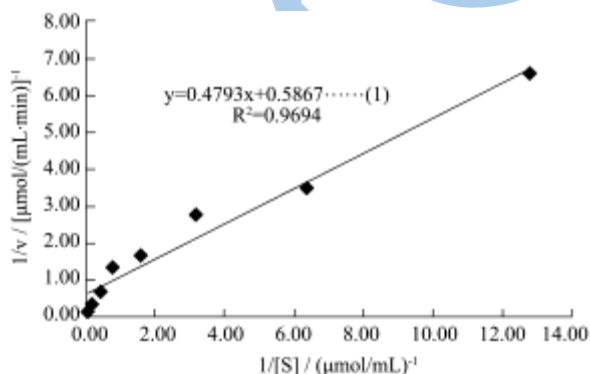


图 5 双倒数法计算 Km 值

Fig.5 Km value calculated by Lineweaver-Burk double reciprocal method

以 pNPG (对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷) 为底物, 测定唾液乳杆菌 XH4B 来源的 α-半乳糖苷酶 Km 值, 结果如图 5 所示。根据散点图画出线性趋势线以

及回归方程 (1): $y = 0.4793x + 0.5867$, 计算可得: 反应条件为柠檬酸缓冲液 (pH 5.5), 反应温度 52 °C 时, 该酶对 pNPG 的 Km 值为 0.817。

Km 值反映的是酶对底物的亲和力, 相当于酶反应速度达到最大速度的 1/2 时底物的浓度, 参照其他 α-半乳糖苷酶对于 pNPG 的 Km 值, 范围为 0.075~12, 其中, 最低值 0.075 来源于 *Thermotoga maritima* (pH 5, 75 °C)^[6], 最高值 12 来源于草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, 反应条件: pH 5.8, 30 °C)^[17]。来源于黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的四种同工酶在同样的反应条件下 (pH 4.5, 50 °C) 表现出不同的 Km 值: α-Gal I 1.4, α-Gal II 0.22, α-Gal III 0.27 和 α-Gal IV 0.24^[18]。

2.5 金属离子及其他试剂对酶促活性的影响

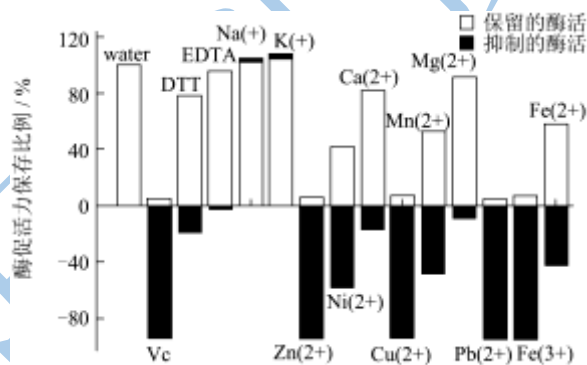


图 6 不同金属离子及其他物质对酶活力的影响

Fig.6 Effects of metal ion and other reagents on catalyst activity

注: 以横坐标为限, 浮上的 (白色) 部分表示残余的酶活力, 沉下的 (条格) 部分表示减少的酶活力, 两者总数为 100%, 或者超过 100% (K^+ 、 Na^+)。

不同金属离子以及 Vc、DTT、EDTA (均为 10 mmol/L) 分别用来配制缓冲液, 以纯水为对照, 检测不同金属离子对唾液乳杆菌 XH4B 来源的 α-半乳糖苷酶酶活力的影响, 结果如图 6 所示。以纯水为参照时, 仅有 K^+ 和 Na^+ 对酶活力有正向的激活作用, 酶活力分别达到了 102.50% 和 104.18%。其他能够较大限度保留酶活力的物质有: EDTA (96.54%), Mg^{2+} (91.53%), Ca^{2+} (82.51%), 以及 DTT (79.38%)。相对而言, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Vc 能够显著阻碍唾液乳杆菌来源的 α-半乳糖苷酶酶促活力, 相对于纯水, 仅能保留 5~7%。另外, 添加 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 或 Mn^{2+} 在酶促反应体系中, 反应结束后, 溶液中会出现明显的红色或深褐色的沉淀。

3 结论

3.1 液乳杆菌 XH4B 来源的 α-半乳糖苷酶为材料进行超滤和柱层析纯化, 结果表明, 超滤时采用 100 kDa

的滤膜,分子量大于 100 kDa 的组分有酶活。利用 Sephadex G200 进行柱层析洗脱 1000 min 后,获得了较多的蛋白峰,洗脱时间 370~400 min 时得到的组分表现出明显的 α -半乳糖苷酶活力,其余的蛋白峰组分均未检测出 α -半乳糖苷酶的活力。SDS-PAGE 电泳结果表明,该酶的蛋白质单体分子量为 70~80 kDa,未变性的酶蛋白应为多聚体(四聚体),总分子量大于 100 kDa。

3.2 蛋白峰面积进行估计, Sephadex G200 的纯化效果约在 10 倍以上;利用酶比活力计算的结果,相对于粗酶,超滤纯化效率为 149.80%,柱层析纯化效率为 391.91%。在柱层析过程中酶促活力有较大程度的损失。

3.3 后,最终确定唾液乳杆菌 XH4B 来源的 α -半乳糖苷酶最佳酶促反应条件为:柠檬酸缓冲液 pH 值 5.5,离子强度 0.15 mol/L,反应温度 52 °C。该酶对 pNPG 的 K_m 值为 0.817。仅有 K^+ 和 Na^+ 对酶活力有正向的激活作用,酶活力分别达到了 102.50% 和 104.18%。EDTA (96.54%), Mg^{2+} (91.53%), Ca^{2+} (82.51%), 以及 DTT (79.38%) 能够较大限度保留酶活力,而 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Vc 则显著阻碍唾液乳杆菌来源的 α -半乳糖苷酶酶促活力,相对于纯水,仅能保留 5~7% 的酶活力。

参考文献

- [1] Falkoski D L, V M Guimaraes, C M Callegari, et al. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial alpha-galactosidases [J]. J. Agric. Food Chem., 2006, 54 (26):10184-10190
- [2] Feutudo J A, M Banik, J D Bewley. The cloning and characterization of alpha-galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed [J]. J. Exp. Bot., 2001, 52 (359): 1239-1249
- [3] Ozsoy N, H Berkkan. Production and characterization of alpha-galactosidase from *Aspergillus flavipes* [J]. Cell Biochem. Funct., 2003, 21 (4):387-389
- [4] Fernandez-Leiro R, A Pereira-Rodriguez, M E Cerdan, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of alpha-galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun., 2010, 66 (Pt 1):44-47
- [5] Mital B K, R S Shallenberger, K H Steinkraus. Alpha-galactosidase activity of lactobacilli [J]. Appl. Microbiol., 1973, 26 (5):783-788
- [6] Garro M S, G F de Valdez, G Oliver, et al. Influence of Carbohydrates on the alpha-Galactosidase Activity of *Lactobacillus fermentum* [J]. Curr. Microbiol., 1996, 33 (5): 302-305
- [7] LeBlanc J G, M S Garro, G Savoy de Giori. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, alpha-galactosidase activity and fermentation products [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 65 (1): 119-123
- [8] 叶雪飞.产 α -半乳糖苷酶乳酸菌的筛选和应用[D].杭州:浙江大学,2008
Ye Xuefei. Isolation and application of lactic acid bacteria with α -galactosidase activity [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008
- [9] Leder S, W Hartmeier, S P Marx. Alpha-galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 [J]. Curr. Microbiol., 1999, 38 (2): 101-106
- [10] Zhao H, L Lu, M Xiao, et al. Cloning and characterization of a novel alpha-galactosidase from *Bifidobacterium breve* 203 capable of synthesizing Gal-alpha-1,4 linkage [J]. FEMS Microbiol. Lett., 2008, 285 (2): 278-83
- [11] Goulas T, A Goulas, G Tzortzis, et al. A novel alpha-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties: gene molecular cloning and heterologous expression [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, 82 (3): 471-7
- [12] Sridhar V R, V V Smeianov, J L Steele. Construction and evaluation of food-grade vectors for *Lactococcus lactis* using aspartate aminotransferase and alpha-galactosidase as selectable markers [J]. J. Appl. Microbiol., 2006, 101 (1): 161-71
- [13] Yoon M Y, H J Hwang. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of alpha-D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* [corrected] JK55 [J]. Food Microbiol., 2008, 25 (6): 815-23
- [14] Bae H C, J W Choi, M S Nam. Purification and characterization of alpha-galactosidase from *Lactobacillus salivarius* subsp *Salivarius* Nam27 [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2007, 27 (1): 102-109
- [15] Carrera-Silva E A, A Silvestroni, J G LeBlanc, et al. A thermostable alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum* CRL722: genetic characterization and main properties [J]. Curr. Microbiol., 2006, 53 (5): 374-8
- [16] Miller E S, Jr Kimberley, N Parker, et al. Alpha-D-galactosidases from *Thermotoga* species [J]. Methods Enzymol, 2001, 330: 246-60

[17] Klasing K C, P Thacker, M A Lopez, et al. Increasing the calcium content of mealworms (*Tenebrio molitor*) to improve their nutritional value for bone mineralization of growing chicks [J]. *J. Zoo. Wildl. Med.*, 2000, 31 (4): 512-7

[18] Ademark P, M Larsson, F Tjerneld, et al. Multiple alpha-galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, 29(6-7): 441-448

现代食品科技