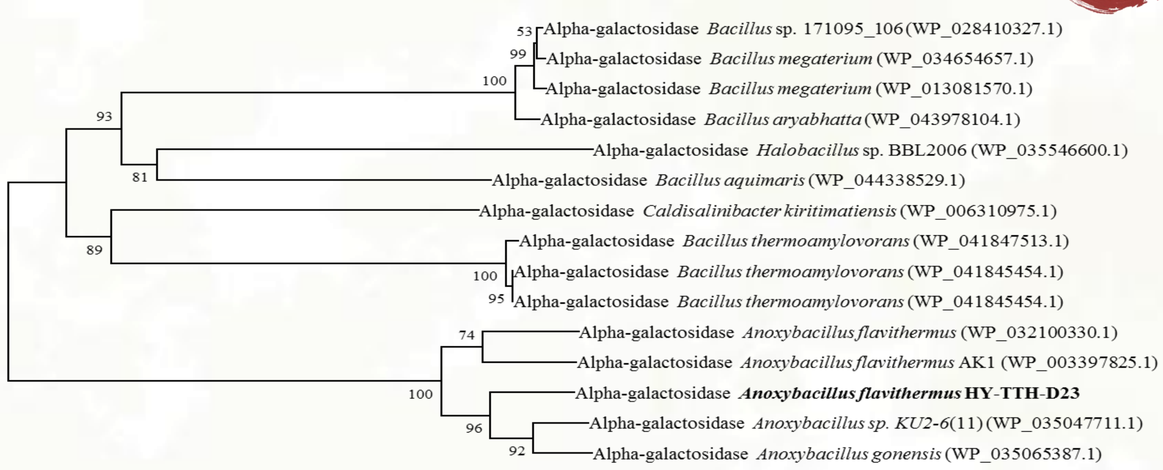
重組 *Anoxybacillus flavithermus* HY-TTH-D23 熱穩定α-半乳糖苷酶酵素生產與特性分析

Production and characterization of recombinant *Anoxybacillus flavithermus* HY-TTH-D23 thermostable α-galactosidase

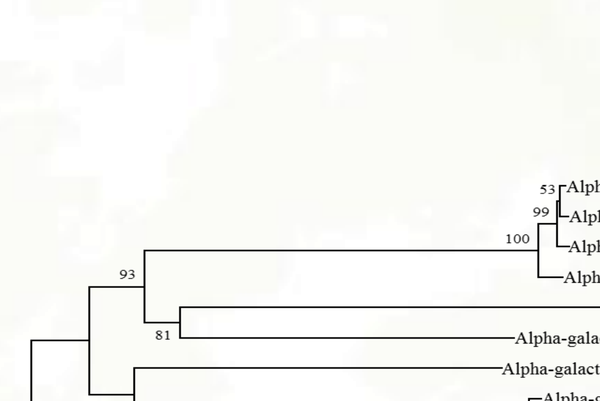
摘要

α-半乳糖苷酶具有食品、製糖、飼料、造紙與醫藥應用價值。本研究由嗜熱性溫泉菌 *Anoxybacillus flavithermus* HY-TTH-D23 選殖出具熱穩定性之 α-半乳糖苷酶 (rAFGAL) 並進行異源表現與特性探討。rAFGAL-GFP 的分子量為 112 kDa，最適作用溫度為 45 與 55°C，最適 pH 值範圍為 5-10。rAFGAL 為目前文獻中第一個從 *Anoxybacillus* spp. 中選殖並異源表現生產的 α-galactosidase。相較於文獻中其他 *Bacillaceae* 科熱穩定 α-galactosidase，其具有最廣泛的 pH 活性範圍和最高的最適作用 pH。在生產方面初步結果顯示以 pET 表現載體系統在 *E. coli* BL21 (DE3) 中所表現的 rAFGAL-GFP 同時以包涵體及可溶性蛋白的形式存在。 rAFGAL-GFP 於 28°C 下培養生產有最高總活性 240.04 U/L ，於 20°C 下培養生產的可溶性蛋白有最高比活性 92.29 U/mg。本研究結果除了希望能對 *Anoxybacillus* spp. 的 α-galactosidase 基本特性有所描述與貢獻外，未來還能將其應用在食品、製糖與飼料等高溫工業製程。

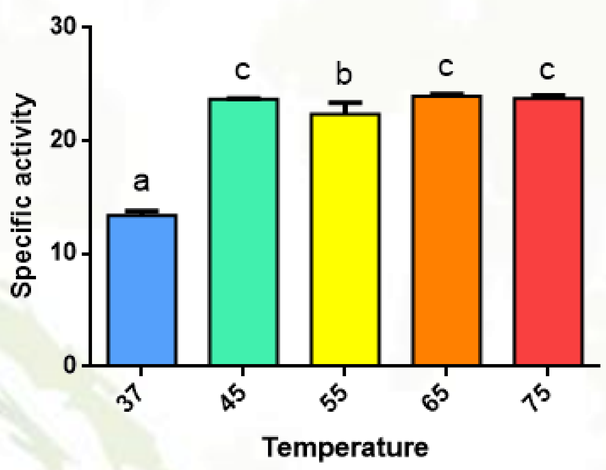
結果



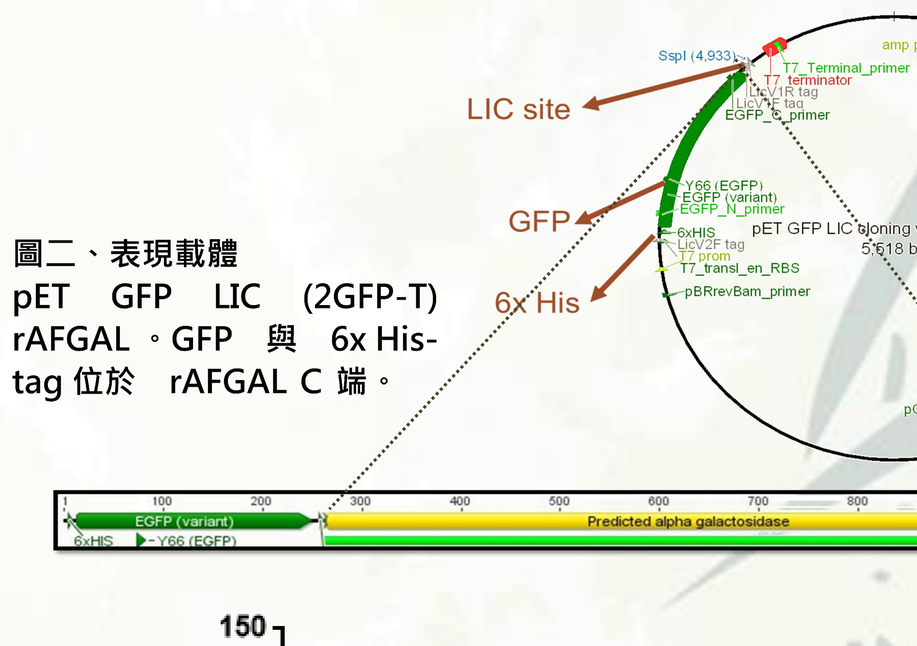
圖一、AFGAL 胺基酸序列親緣關係樹。*Anoxybacillus* spp. 的 α-galactosidase 與已知的近親中對應基因的胺基酸序列顯著不同，自成一個分支。



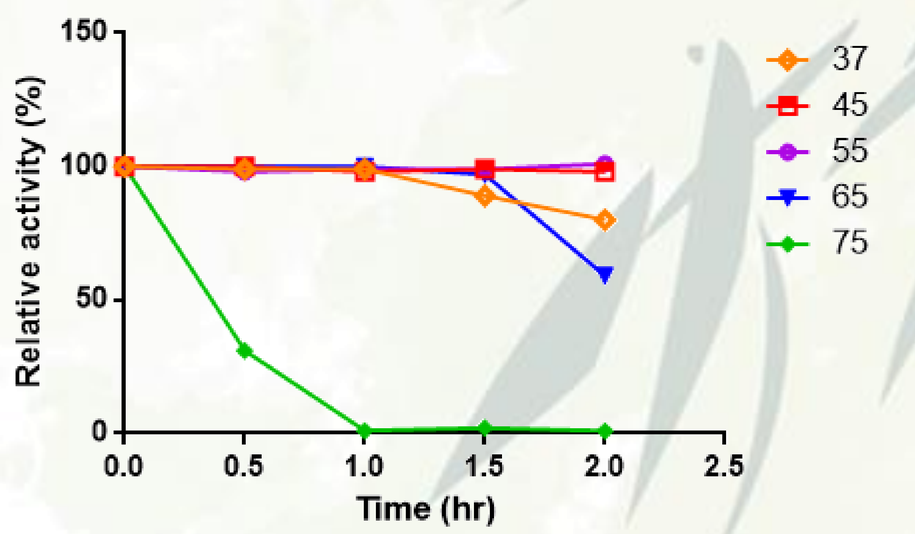
圖三、以 HisTrap HP column 純化可溶性 rAFGAL-GFP。



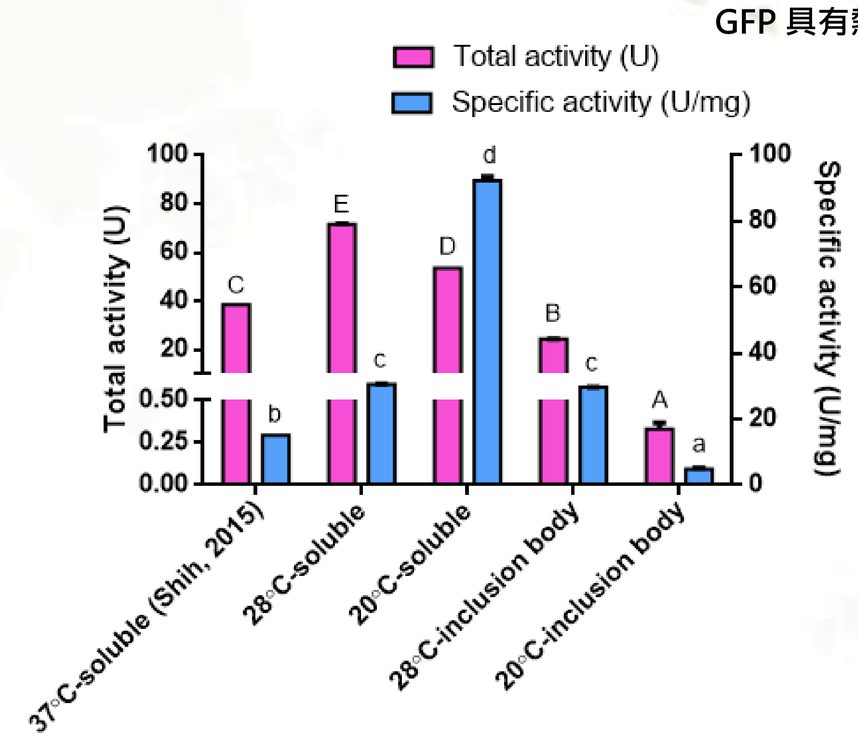
圖四、 rAFGAL-GFP 於不同溫度下初始活性。37°C 下初始活性較低，顯示 rAFGAL-GFP 具有熱活化特性。



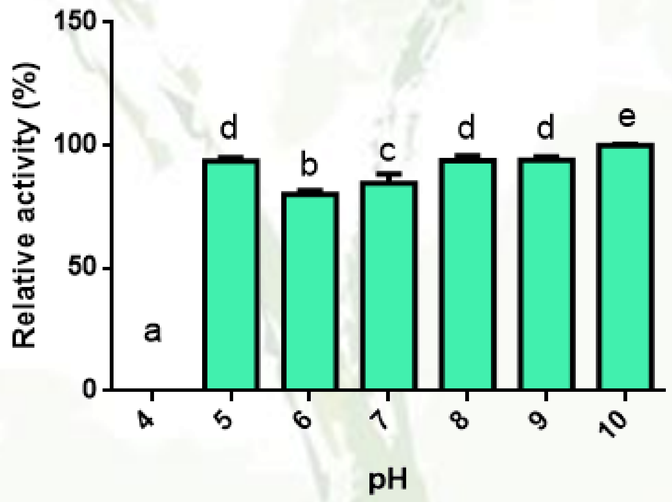
圖二、表現載體 pET GFP LIC (2GFP-T) rAFGAL。GFP 與 6x His-tag 位於 rAFGAL C 端。



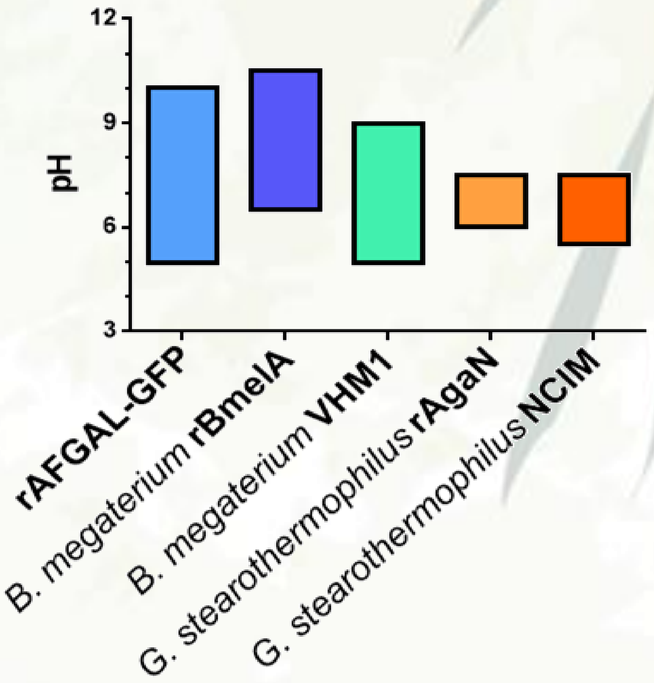
圖五、rAFGAL-GFP 的熱穩定性。45-55°C 下有最佳熱穩定性，在 65°C 下 2 小時仍有超過 50% 活性。



圖六、不同培養溫度生產之 rAFGAL-GFP 酵素總活性與比活性。降低培養溫度有助於提高單位體積產量。



圖七、pH 值對 rAFGAL-GFP 活性之影響。在 pH 5-10 的範圍內皆維持高活性。



圖八、與文獻中 α-galactosidase 最適反應 pH 範圍之比較。rAFGAL-GFP 的最適反應 pH 範圍最大，在熱穩定 α-galactosidase 中最適反應 pH 最高。