

## 嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株异源二聚体 $\beta$ -半乳糖苷酶的克隆表达

潘渠<sup>1,2</sup>, 李晋川<sup>1</sup>, 丛延广<sup>2</sup>, 刘丽娜<sup>2</sup>, 朱军民<sup>2</sup>, 胡福泉<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>成都医学院病原教研室, 成都 610083)

(<sup>2</sup>第三军医大学基础部微生物学教研室, 重庆 400038)

**摘要:**嗜酸乳酸杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 的异源二聚体 $\beta$ -半乳糖苷酶属于糖苷水解酶 2 家族, 由两个部分重叠、协同翻译的基因编码 (*lacL* 和 *lacM*)。【目的】克隆表达该酶并测定其酶学特性。

【方法】参照已全基因组测序的嗜酸乳酸杆菌 NCFM 菌株, 以嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株基因组为模板, 将 *lacL* 的 RBS 到 *lacM* 的终止子之间的序列 (2834 bp) 克隆到 pQE31 质粒上, 并电转化 JM109 菌株。以下列步骤纯化表达产物: 硫酸铵分级沉淀、阴离子交换、亲和层析和凝胶排阻层析。以凝胶排阻层析测定纯化酶的天然分子量, 以邻硝基苯基半乳糖为底物测定其酶学特性。【结果】实现了该酶在 JM109 菌株中的可溶性表达。其氨基酸序列有一处不同于嗜酸乳酸杆菌 NCFM 菌株, 即其大亚基 (LacL) 的第 512 位氨基酸不是组氨酸而是精氨酸。纯化酶比活力为 226 U/mg 蛋白, 天然分子量为  $96.3 \pm 4.6$  kDa, 最适 pH 为 7, 最适温度为 49°C,  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别是:  $2.18 \pm 0.12$  mmol/L,  $273 \pm 5$  U/mg 蛋白。

**关键词:**嗜酸乳酸杆菌;  $\beta$ -半乳糖苷酶; 克隆表达; 纯化;  $K_m$  值

**中图分类号:** Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1339-05

$\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase, EC 3. 2. 1. 23) 是糖苷水解酶, 能水解半乳糖苷类化合物中的 $\beta$ -1, 4-D-半乳糖苷键, 还能转移半乳糖苷生成低聚半乳糖 (galacto-oligosaccharide, GOS)。该酶在乳制品行业和医药业上有广泛的应用, 例如: 利用该酶水解牛奶中的乳糖生产甜牛奶和低乳糖奶; 利用该酶回收利用乳清 (奶酪生产中产生的废料, 含大量乳糖) 中的乳糖; 利用该酶的转半乳糖苷活性生产益生元 GOS, GOS 是功能性食品添加剂<sup>[1]</sup>; 制成肠溶片, 治疗乳糖不耐受 (Lactose intolerance)<sup>[2]</sup>。

早先发现的 $\beta$ -半乳糖苷酶都是由一个基因编码的, 近年来发现了由两个基因编码的异源二聚体 $\beta$ -半乳糖苷酶 (LacLM)。最先在乳明串珠菌 (*Leuconostoc*

*lactis*) 中发现<sup>[3]</sup>, 继而在清酒乳酸杆菌 (*Lactobacillus sake*)<sup>[4]</sup>、瑞士乳酸杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)<sup>[5]</sup>、植物乳酸杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)<sup>[6]</sup>等细菌中也被发现。从已经完成全基因组测序的细菌来看, 在更多的益生菌 (probiotics) 中发现了编码该酶的基因。异源二聚体 $\beta$ -半乳糖苷酶由大亚基 (LacL) 和小亚基 (LacM) 构成。其大、小亚基的编码基因位于一个受乳糖诱导<sup>[7]</sup>的操纵子内, 并且部分重叠、协同翻译。

嗜酸乳酸杆菌 NCFM 菌株基因组 DNA (GenBank Accession No. CP000033) 已完成测序<sup>[8]</sup>。特殊的是, 该菌携带有 3 个 $\beta$ -半乳糖苷酶编码基因: *lacA*、*lacZ* 和 *lacLM*。进一步的研究发现 LacLM 是该菌降解乳糖的主要酶<sup>[9-11]</sup>。通过序列比对, 发现其基因和其它

基金项目: 四川省科技攻关项目 (05SG022-019)

\*通讯作者。Tel: +86-23-68752240; E-mail: hoofuquan@yahoo.com.cn

作者简介: 潘渠 (1973-), 男, 四川成都人, 在读博士研究生, 讲师。E-mail: ppqlove2006@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-08; 修回日期: 2008-06-12

菌的 *lacLM* 有显著的差异,与其最相似的瑞士乳酸杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) 的 *lacLM* 只有 74% 的相似性。基因上显著的差异很可能导致该酶降解乳糖的能力不同。为了进一步研究其酶学特性,并为其工业应用打下基础,本研究克隆表达了嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株异源二聚体 $\beta$ -半乳糖苷酶,并测定了纯化后的异源二聚体 $\beta$ -半乳糖苷酶的酶学特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒:**嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株购自中国科学院微生物研究所菌种保藏库。培养条件是 37℃, MRS 培养液中静置培养 24~48 h。大肠杆菌 JM109 菌株为本实验室保存,培养条件是 37℃, LB 培养基中振荡培养过夜。抗生素筛选浓度为氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL。质粒 pQE31 为本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**用上海华舜公司试剂盒进行 PCR 产物回收、电泳条带回收及质粒的小量制备。限制性内切酶购自 Fermentas (Vilnius, Lithuania), ExTaq 酶购于 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 Promega (WI, USA), 邻硝基苯基半乳糖 (*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, ONPG)、邻氨基苯基-1-硫- $\beta$ -半乳糖苷-琼脂糖 (agarose-*p*-aminobenzyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside, ABTG-Agarose) 购自 sigma 公司 (St. Louis, MO, USA), 其它化学试剂购自上海生物工程公司。PCR 扩增剂购自英国 Hybaid 公司。凝胶成像分析系统、BioLogic LP 层析仪、BioLogic Duo-flow 层析仪和 Smartspec3000 分光光度仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株基因组 DNA 的提取

从 2.5 mL 培养物中离心收集菌体,加入 1 mL Tris-HCl 溶液 (20 mmol/L, pH 8.0) 洗涤菌体,离心收集菌体,用 0.5 mL 溶菌液 (10 mmol/L Tris-HCl, 12% PEG20000, 10 mg/mL 溶菌酶, pH 8.0) 重新悬浮,37℃ 静置 2 h,离心 (4000 $\times$ g), 15 min) 收集菌体<sup>[12]</sup>, 接下来使用 CTAB 法提取基因组 DNA<sup>[13]</sup>。

### 1.3 *lacLM* 基因表达载体的构建

根据已测序的嗜酸乳酸杆菌 NCFM 菌株的 *lacLM* 基因序列 (图 1), 设计 5' 端引物为: 5'-CAGAA-TTCATCAGGTATTAGTATGCAAGCAAACA-3', 3' 端引物为: 5'-GCCTGCAGTTAATTAAGATTGAAAG-AAAATTCGT-3', 下划线为引入的酶切位点。扩增片

段长 2850 bp。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 95℃ 40 s, 55℃ 30 s, 72℃ 130 s, 20 个循环; 72℃ 10 min。凝胶电泳检测 PCR 结果, PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 产物。

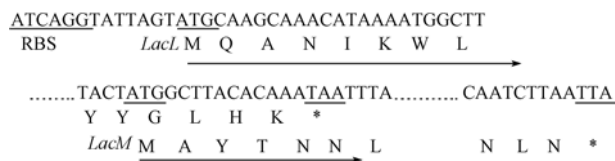


图 1 嗜酸乳酸杆菌 NCFM 菌株 *lacL* 和 *lacM* 基因的 RBS 和重叠区域

Fig. 1 Overlapping coding region and RBS of the *lacL* and *lacM* genes of *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

双酶切纯化的 PCR 产物和 pQE31 质粒, 然后用 T4DNA 连接酶连接, 再电转化大肠杆菌 JM109 菌株。以含氨苄青霉素、x-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选转化子。双酶切、PCR 和测序鉴定转化子。构建的重组质粒命名为: pQE31-*lacLM* (图 2)。

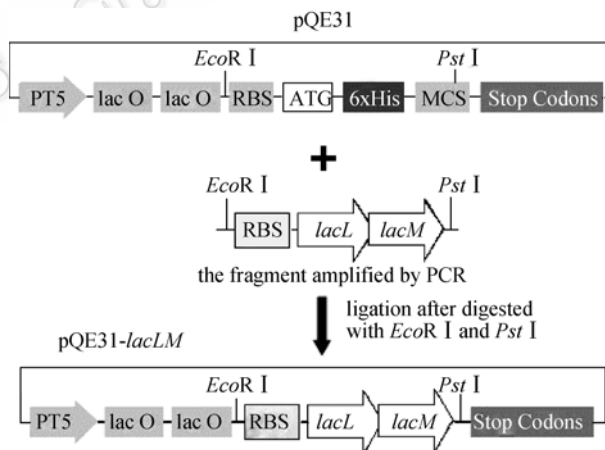


图 2 重组质粒 pQE31-*lacLM* 的构建图

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pQE31-*lacLM*.

### 1.4 重组 LacLM 的诱导表达和纯化

根据预实验结果, 将培养过夜的重组菌株培养物以 1/50 比例接种含氨苄青霉素和 0.5% 乳糖的 LB 培养液, 并加 IPTG 致终浓度为 0.4 mmol/L, 30℃ 摇床培养 20 h。离心收集菌体, 冰上超声波破碎菌体, 离心 (12000  $\times$  g, 45 min) 收集上清液。

重组 LacLM 的纯化<sup>[14, 15]</sup>: 取酶活性高的硫酸铵沉淀对 buffer F1 (NaCl 浓度为 0.12 mol/L 的 buffer F) 透析, 然后加入 UnoQ 强阴离子交换柱, 再以 buffer F2 (NaCl 浓度为 0.37 mol/L 的 buffer F) 洗脱。洗脱

液对 buffer F1 透析后, 加入以 ABTG-Agrose 为填料的亲和层析柱, 以 buffer F3 (NaCl 浓度为 0.42 mol/L 的 buffer F) 洗脱。再加入用 buffer F (20 mmol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 20 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 15  $\mu\text{L/L}$   $\beta$ -巯基乙醇, PH 6.6) 平衡的 Sephadex G200 凝胶柱 (120 cm  $\times$  1.5 cm), 收集酶活性高的峰。SDS-PAGE 电泳检测纯化效果。使用 Bradford 法测定纯化蛋白浓度。

### 1.5 纯化的重组 LacLM 的性质研究

**1.5.1 天然分子量测定:** 以大肠杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶 (116 kDa)、乳酸杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶 (76 kDa)、牛血清白蛋白 (BSA, 66 kDa) 和蛋清溶菌酶 (14 kDa) 为 Marker, 通过凝胶排阻层析 (Sephadex G200 凝胶柱, 条件同上) 测定重组 LacLM 的天然分子量。

**1.5.3 酶学分析:** 酶活性测定方法根据文献<sup>[6]</sup>修改: 反应温度修改为 49 $^{\circ}\text{C}$ 。设定在该反应条件下, 每分钟释放 1 微摩尔邻硝基苯酚为一个酶活单位 (U)。用极限耗尽法测定该反应体系中 ONP 的毫摩尔消光系数 (CmM420), 该法的原理是溶液中所有 ONPG 最终都会被酶降解, 所以当  $OD_{420}$  值稳定时, ONP 的浓度等于初始 ONPG 的浓度。测得  $\text{CmM420}=1.324 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。以系列稀释的底物溶液测定酶动力曲线, 以不同 pH 值的反应液测定最适 pH 值, 在不同的温度反应以测定最适温度。

## 2 结果和分析

### 2.1 lacLM 基因表达载体的构建

连接产物电转化大肠杆菌 JM109 菌株后, 在筛选平板上长出了蓝色的重组菌落。双酶切和 PCR 鉴定均正确。测序表明有 3 个碱基不同于嗜酸乳酸杆菌 NCFM 菌株的 lacLM 基因序列。氨基酸序列有一处不同, 即其大亚基 (LacL) 的第 512 位氨基酸不是组氨酸而是精氨酸。序列提交 GenBank, 登录号为: EU590651。

### 2.2 重组 LacLM 的诱导表达和纯化

重组菌株诱导后, 在超声波破碎菌体后的上清液中酶活达到 25.5 U/mL, 由此推知, 诱导后的菌液中含有约 2.55 kU/L 的酶活。通过 4 个纯化步骤, 重组 LacLM 基本达到了电泳纯, 其比活力为 226 U/mg 蛋白。

LacL 和 LacM 的理论分子量分别是 73271 和 35817 Da, 分别对应 73 kDa 和 36 kDa 条带 (图 3)。这说明重组 LacLM 实现了可溶性表达。我们在 37 $^{\circ}\text{C}$  以高浓度 IPTG (8 mmol/L) 诱导重组菌株, 其表达

形式仍然是可溶性表达, 未见包涵体形成 (结果没发表)。ABTG 是 $\beta$ -半乳糖苷酶的底物类似物, 酶能与之结合, 却不能将其降解。将其和 Agarose 共价连接后, 就成了很好的 $\beta$ -半乳糖苷酶亲和纯化试剂。在本研究中却没有达到好的效果, 显然 ABTG-Agarose 结合酶的同时还结合了许多杂蛋白 (图 3 的第 4 泳道)。与亲和层析相反, 凝胶排阻层析的纯化效率较高 (图 3 的第 5 泳道)。在泳道上可见明显的 36 kDa 和 73 kDa 目标条带, 不过在 73 kDa 目标条带上仍然有一条微弱杂带。

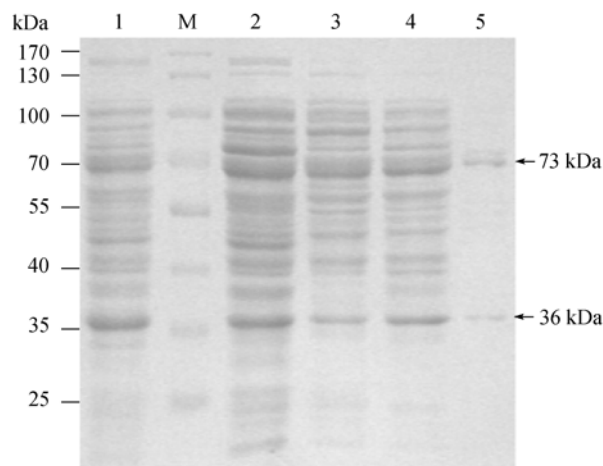


图 3 异源二聚体 $\beta$ -半乳糖苷酶四步纯化的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE of the purified heterodimeric  $\beta$ -galactosidase from the recombination strain. 1. sonication supernatant of the induced recombination strain; M. protein marker; 2. ammonium sulfate precipitation; 3. UnoQ anion chromatography; 4. Affinity chromatography on ABTG-Agarose; 5. Gel permeation chromatography on Sephadex G200.

### 2.3 纯化的重组 LacLM 的性质研究

以各蛋白 marker 的洗脱体积对分子量的对数进行线性回归, 测得 LacLM 的天然分子量为  $96.3 \pm 4.6$  kDa, 与其理论分子量和 SDS-PAGE 电泳测得的大小亚基分子量之和 ( $36+73=109$  kDa) 很接近, 说明 LacLM 的活性形式是由一个大亚基和一个小亚基构成的异源二聚体。

经检测 LacLM 最适温度为 49 $^{\circ}\text{C}$ , 在 33 $^{\circ}\text{C}$  ~ 60 $^{\circ}\text{C}$  范围内均有较大的活性。值得注意的是该酶在 60 $^{\circ}\text{C}$  仍能保持 49% 的活性, 这一对热耐受的特点使该酶有可能应用于低乳糖奶的生产, 因为可以消毒和降解乳糖同时进行。

实验结果表明, 该酶最适 pH 为 7, 在 pH 6 ~ 7 范围内保持较大活性。该酶对碱性条件非常敏感, 当

pH 为 7.5 时, 酶活降至 35%, 而当 pH 达到 8.0 时, 就几乎完全失去活性 (活性只剩 1%)。

酶的动力学反应显示, 该酶对 ONPG 的  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别是:  $2.18 \pm 0.12$  mmol/L,  $273 \pm 5$  U/mg 蛋白 (图 4)。在测定过程中发现, 当反应体系中 ONPG 浓度 (mmol/L) 与酶浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 之比大于 18.3 时, ONPG 开始抑制酶活, 比值越大抑制越显著。

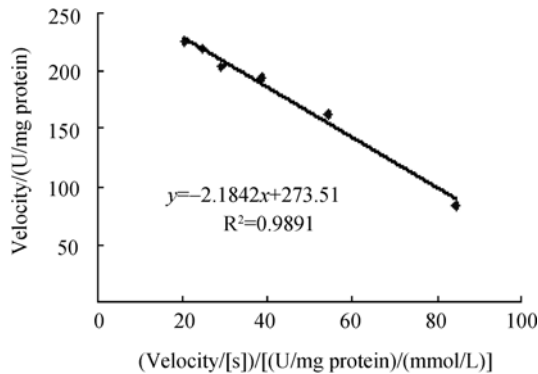


图 4 LacLM 的酶动力学曲线(Eadie Hofstee plot)  
Fig. 4 Kinetic analysis of LacLM (Eadie Hofstee plot).

### 3 讨论

细菌的基因重叠现象较为普遍, 约 1/3 的细菌基因是重叠基因。这是细菌调控基因表达的一种机制<sup>[17]</sup>。本研究克隆表达的两个重叠基因就利用 17 bp 的重叠(图 1)实现了协同翻译。*lacM* 没有 RBS, 核糖体只能从 *lacL* 开始翻译。翻译到基因重叠处时, 核糖体释放 LacL 肽链之后, 立即识别 *LacM* 的起始密码子并开始翻译 *LacM*。这种机制确保以 1:1 的比例翻译两基因。而 LacL 和 LacM 正是以 1:1 的比例聚合为异源二聚体发挥 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的<sup>[2,11,16]</sup>。本研究证实嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株的 LacLM 也是异源二聚体。

在克隆表达嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株的 LacLM 时, 为了保持其酶学特性不变, 希望重组 LacLM 的氨基酸序列和 LacLM 完全相同。为达到这个目的, 我们利用 pQE31 载体 *LacO* 与 RBS 之间的 *EcoR*I 酶切位点和多克隆位点 (MCS) 上的 *Pst*I 酶切位点切掉了该载体上的 His-Tag 和 RBS (图 2), 构建了重组质粒 pQE31-*lacLM*。插入其中的 *lacLM* 基因的翻译由自带的 RBS 起始。一般 pQE31 是以包涵体形式表达蛋白质, 而通过这样的改造, 实现了稳定的

可溶性表达。这可能是切换 RBS 影响了表达调控所致。

克隆表达的嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株 LacLM 的氨基酸序列和嗜酸乳酸杆菌 NCFM 菌株 LacLM (GenBank accession no. AAV43287 and AAV43288) 以及嗜酸乳酸杆菌 R22 菌株 LacLM (GenBank accession no. ABK59934 and ABK59935) 仅仅有一个氨基酸的差异, 就是大亚基第 512 位氨基酸不是组氨酸而是精氨酸。通过保守区域分析, 大亚基的第 512 位氨基酸不是保守氨基酸, 在各种乳酸杆菌中存在多样性。嗜酸乳酸杆菌 R22 菌株的 LacLM 已经被提纯<sup>[11]</sup>。其酶学特性与嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株 LacLM 有差异, 其最适温度高 6 $^{\circ}\text{C}$ , 最适 pH 高 0.5,  $K_m$  值小 1.45 mmol/L,  $V_{max}$  值大 88 U/mg 蛋白。这些差异可能是大亚基第 512 位氨基酸的变异造成的。

嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株的异源二聚体 $\beta$ -半乳糖苷酶在 60 $^{\circ}\text{C}$  仍能保持 49% 的活性, 在中性或微酸性条件下有很好的活性, 具有良好的工业或医药应用价值。本文的克隆表达和纯化研究为其应用打下了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Kunz C, Rudloff S, Baier W, *et al.* Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr*, 2000, 20: 699–722.
- [2] Montalto M, Curigliano V, Santoro L, *et al.* Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol*, 2006, 14; 12(2): 187–191.
- [3] David S, Stevens H, van Riel M, *et al.* *Leuconostoc lactis* beta-galactosidase is encoded by two overlapping genes. *J Bacteriol*, 1992, 174(13): 4475–4481.
- [4] Obst M, Meding ER, Vogel RF, *et al.* Two genes encoding the beta-galactosidase of *Lactobacillus sake*. *Microbiology*, 1995, 141(Pt 12): 3059–3066.
- [5] Zwahlen MC, Mollet B. ISL2, a new mobile genetic element in *Lactobacillus helveticus*. *Mol Gen Genet*, 1994, 245(3): 334–338.
- [6] Silvestroni A, Connes C, Sesma F, *et al.* Characterization of the *melA* locus for alpha-galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(11): 5464–5471.
- [7] Fortina MG, Ricci G, Mora D, *et al.* Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(6): 3238–3243.
- [8] Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, *et al.* Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactoba-*

- cillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(11): 3906–3912.
- [9] Barrangou R, Azcarate-Peril MA, Duong T, *et al.* Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3816–3821.
- [10] W M Russell, T R Klaenhammer. Efficient system for directed integration into the *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri* chromosomes via homologous recombination. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9): 4361–4364.
- [11] Nguyen TH, Splechtna B, Krasteva S, *et al.* Characterization and molecular cloning of a heterodimeric beta-galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 269(1): 136–144
- [12] 王红梅, 李大金, 袁正宏. hCG $\beta$ 在乳酸杆菌中的分泌性表达. 生殖与避孕 (*Reproduction & Contraception*), 2003, 23(3): 129–134.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* 马学军, 等译. 精编分子生物学实验指南. 第四版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [14] Nguyen TH, Splechtna B, Steinbock M, *et al.* Purification and characterization of two novel beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(14): 4989–4998.
- [15] Reyhan Gul-Guven, Kemal Guven, Annarita Poli, *et al.* Purification and some properties of a  $\beta$ -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from antarctica. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(6), 1570–1577.
- [16] Thu-Ha Nguyen, Barbara Splechtna, Montarop Yamabhai, *et al.* Cloning and expression of the  $\beta$ -galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129(4): 581–591.
- [17] Johnson ZI, Chisholm SW. Properties of overlapping genes are conserved across microbial genomes. *Genome Res*, 2004, 14(11), 2268–2272.

## Cloning, expression and characterization of a heterodimeric beta-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Qu Pan<sup>1,2</sup>, Jinchuan Li<sup>1</sup>, Yanguang Cong<sup>2</sup>, Lina Liu<sup>2</sup>, Junmin Zhu<sup>2</sup>, Fuquan Hu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**Abstract:** Heterodimeric beta-galactosidase of *Lactobacillus acidophilus* belongs to glycoside hydrolase family 2, encoded by two overlapping and translational coupling genes, *lacL* and *lacM*. The *lacL* and *lacM* genes of the sequenced strain *L. acidophilus* NCFM encode polypeptides with calculated molecular masses of 73,253 and 35,817 Da, respectively. **[Objective]** To clone, overexpress and characterize the enzyme in *Escherichia coli*. **[Methods]** We cloned the fragment (2834 bp) containing ribose-binding site (RBS) and coding regions of the *lacLM* genes from *L. acidophilus* ATCC 4356 into expression vector pQE31. RBS and HIS-Tag of pQE31 were substituted by inserted fragment. Recombinant plasmid was electrotransformed into *E. coli* JM109. Expression product was purified by ammonium sulphate fractionation, anion-exchange, affinity chromatography and gel permeation. Native molecular mass of homogenous enzyme was measured by gel permeation, and beta-galactosidase activity was determined by using *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) as the substrate. **[Results]** Overexpression of the soluble enzyme in *E. coli* was achieved. Amino acid residue 512 of recombinant LacL was different from that of *L. acidophilus* NCFM. Homogenous enzyme was obtained by purification. The homogenous enzyme had a specific activity of 226 U/mg protein, a native molecular mass of 96.3 $\pm$ 4.6 kDa, an optimum temperature at 49 $^{\circ}$ C and an optimum pH of 7. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the enzyme were 2.18 $\pm$ 0.12 mmol/L, 273 $\pm$ 5 U/mg protein respectively.

**Keywords:** *Lactobacillus acidophilus*; beta-galactosidase; clone; expression; purification;  $K_m$  value