

植物 β -半乳糖苷酶

田爱梅^{1,2} 刘金龙² 曹家树^{2*}¹西安文理学院生物技术学院, 西安 710065; ²浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029)

摘要 β -半乳糖苷酶是一个与细胞壁降解相关的酶, 广泛分布于植物组织中, 参与一系列的生理生化过程, 如植物的花粉发育、果实成熟及生长过程中多糖的裂解。目前, 已从多种植物中分离到 β -半乳糖苷酶基因。 β -半乳糖苷酶基因属于多基因家族, 随着研究的深入, 其不同水平的转录本在不同植物的不同组织中被发现。但目前 β -半乳糖苷酶在植物发育中确切的作用机制尚不明确。现介绍目前这一领域内细胞与分子生物学方面的研究进展, 并结合所在课题组的研究结果进行相关探讨, 为进一步研究 β -半乳糖苷酶在植物中的作用机制提供新的线索。

关键词 β -半乳糖苷酶; 基因表达; 生物学功能

Beta Galactosidase in Plants

Tian Aimei^{1,2}, Liu Jinlong², Cao Jiashu^{2*}¹College of Biological Technology, Xi'an University, Xi'an 710065, China;²Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Beta galactosidase is an enzyme associated with cell wall degradation. It is widely distributed in plant tissues, taking part in a series of physiological and biochemical processes. According to recent studies, beta galactosidase genes have already been isolated from a number of plant species. Beta galactosidase genes belong to a multigene family. Increasing studies have shown that different members of beta galactosidase gene family exhibit a wide range of expression profiles throughout plants development. However, their precise biological function *in vivo* still remains controversial. In this review, we presented recent information on cell and molecular biology referring to the results of our investigation. This study may also facilitate us to fully understand their mechanism of action in plant.

Key words beta galactosidase; gene expression; biological function

引言

β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -Gal)是一个与细胞壁降解相关的酶, 能够从 β -半乳糖支链非还原末端切除 β -半乳糖残基, 既能降解果胶和半纤维素, 也能降解糖蛋白和糖脂, 使细胞壁中一些组分变得不稳定, 促使细胞壁膨胀进而软化, 为植物的快速生长发育释放储存的能量。 β -半乳糖苷酶还参与衰

老过程中细胞壁的降解, 如多糖、糖蛋白和半乳糖脂的水解, 释放游离半乳糖^[1-3]。在种子、幼苗、花粉和果实等植物生长发育各阶段均可以检测出 β -半乳糖苷酶的活性和基因的表达。 β -Gal基因属于多基因家族。植物 β -Gal基因分为两个类群, 其中类群I的氨基酸序列为712~731个, C端不含凝集素结构域(lectin-like domain); 类群II氨基酸序列为832~888个, C端含

收稿日期: 2013-12-26 接受日期: 2014-02-10

国家自然科学基金(批准号: 31372083)和西安市科技计划项目(批准号: CX12189WL06)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88982188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

Received: December 26, 2013 Accepted: February 10, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31372083) and Xi'an Science and Technology Project (Grant No.CX12189WL06)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

网络出版时间: 2014-04-29 15:35 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0429.html>

凝集素结构域。本文主要介绍了 β -Gal的来源、生化特性、在植物生长发育中的功能及主要应用。同时,我们研究组从白菜雄配子减数分裂的胞质分裂突变体(male meiotic cytokinesis, *mmc*)与其野生型植株花蕾差异表达的基因中,分离到一个 β -Gal基因^[4],这一研究结果将为研究 β -Gal在生殖发育中的功能提供新的思路。

1 β -Gal的来源

β -半乳糖苷酶的天然来源十分丰富,包括多种微生物、植物和动物。 β -Gal的动物来源主要有肠、脑等器官和皮肤组织。在微生物中, β -Gal在细菌、真菌和酵母中均有分布。真菌中的 β -Gal是一类热稳定的酶,但容易受到半乳糖等产物的抑制。酵母中的 β -Gal因其可用于生产低乳糖的牛奶而在食品领域备受关注^[5]。植物中的 β -Gal与细菌相比有很大的差异。细菌的 β -Gal通常是四聚体或者单体,并且较植物常为二聚体的酶分子量更大^[6]。 β -Gal广泛分布于植物组织中,参与到一系列的生理生化过程中,如植物生长、果实成熟和乳糖的裂解。研究发现, β -Gal在果实发育和成熟过程中具有重要的作用^[7-8]。在果实成熟过程中, β -Gal可以降低细胞壁多糖及果胶^[9],在番茄、柿子、木瓜和草莓的果实成熟过程中均检测到 β -Gal的活性^[10-11]。

2 β -Gal的特性

β -半乳糖苷酶可以裂解聚合物、寡糖和次生代谢产物中的半乳糖残基。 β -Gal能在一个相对广泛的pH环境中工作,在真菌中pH2.5~5.4、酵母和细菌中pH6.0~7.0。所有这些 β -Gal可分为两类,其中一类为糖苷水解酶II家族,这一类主要在微生物中发现;另一类是糖苷水解酶35家族,这一类大约70%的成员来源于植物。也有报告称,在植物中该酶的最适pH在酸性范围,而在细菌中该酶更趋向于中性环境。Dwevedi和Kayastha从豌豆中分离得到一个经典的 β -Gal(*Ps* β -Gal)^[3]。pH5.0时,能够从成熟种子的液泡中分离到*Ps* β -Gal,该酶能裂解豌豆种子中的木葡聚糖,并且在幼苗生长和发育时期能改变细胞壁结构。在高等植物中, β -Gal是唯一可以内切方式切割 β -1,4-半乳糖体的酶,进而裂解来自细胞壁多糖的半乳糖残基^[12-13]。它可以水解 β -D-半乳糖苷末端非还原性的 β -D-半乳糖残基,从而降低成熟果实中半

乳糖残基的含量^[14]。较多的研究表明, β -Gal不仅可以为快速生长释放储存的能量,还能够在正常的多糖代谢、细胞壁组分代谢以及衰老过程中细胞壁降解、糖蛋白以及半乳糖脂末端半乳糖残基的水解,释放自由的半乳糖。另外,许多 β -Gal可以在体外适宜的热力学条件下,通过转糖基作用和反向水解作用发挥其特异的生物活性。事实上,在果实成熟过程中,细胞壁组分的显著变化之一是在 β -Gal作用下与细胞壁结合的半乳糖残基的减少。这种现象在多种果实中,如巴特利特梨、日本梨、苹果、番茄等得到证实^[12-14]。

3 β -Gal在植物生长发育中的功能

3.1 β -Gal在花粉发育中的功能

植物花粉壁由花粉内壁和外壁组成,在植物花粉发育过程中起着重要作用。花粉壁的发育正常与否受花药发育和减数分裂等多方面因素的影响。由孢粉素构成的花粉外壁性质稳定,能够有效保护花粉而免受外界环境的影响。孢粉素等花粉壁成分的合成与分解过程极其复杂,其代谢过程是众多基因共同作用的结果。如阿拉伯半乳糖和多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白等基因是参与花粉壁合成的重要基因,而 β -半乳糖苷酶等基因是参与花粉壁分解的重要基因,例如果胶甲酯酶基因(pectin methylesterase, *PME*)等^[12-14]。因此,充分认识花粉壁代谢过程参与的基因有助于对其进行精确调控。

在拟南芥中,*At* β -Gal7、*At* β -Gal15、*Os* β -Gal5、*Os* β -Gal12、*Os* β -Gal14和*Os* β -Gal15能在小孢子发育早期和花粉发育过程中发挥功能^[15],聚类分析发现这6个基因分布在同一亚家族中。*At* β -Gal11、*At* β -Gal13、*Os* β -Gal10和*Os* β -Gal10在成熟花粉中表达量最高。在烟草花粉中也检测到有 β -Gal的表达,Northern杂交显示该基因在发育中的花药和成熟花粉粒中特异表达,在减数分裂时其表达量较低,但在有丝分裂后的小孢子发育后期表达量急剧上升,表明其在花粉管生长过程也能发挥作用^[16]。在白菜(*Brassica campestris*)中,通过细胞化学染色检测到花药中含有 β -Gal活性缺失突变体*gal*(galactosidase)。*gal*是从白菜花粉中分离得到的自然发生的雄配子体转录分子标记。在基因杂合状态下,蓝色不透明的正常花粉粒与黄色透明的非正常花粉粒发生1:1分离,在隐性纯合状态时,所有的花粉粒均表现出突

变体的性状, 这符合孟德尔自由组合定律。与野生型花粉粒相比, 携带 gal 基因的花粉粒受精时竞争能力要差, 回交和正反交结果表明, 这种缺陷是由隐性单基因 gal 控制的^[17]。

3.2 β -Gal在果实成熟中的功能

Pressey^[18]最先从番茄中纯化出3种 β -Gal(TBGs), 并且证实只有 β -GalII具有外切半乳糖酶活性。随后, Smith等^[19]克隆到了编码 β -GalIII的cDNA序列, 并且得到了另外6个与它具有氨基酸同源性的cDNA序列。Yoshioka等^[20]从0 °C贮存了5个月的苹果细胞壁提取物中检测到了4种 β -Gal活性(GA-I~IV)。GA-I活性在采收时检测不到, 随着果实的成熟, 酶的活性增加, 其他的酶亚型在采收时活性最高, 随着果实在贮藏中的软化而酶活性下降。Smith等^[12,14]对番茄7个 β -Gal基因的研究表明, 它们在果实的发育过程中有着复杂的表达模式。陈昆松等^[21]对猕猴桃的分析发现, 在果实采收时, β -Gal基因的mRNA含量最高, 随果实的衰老呈下降趋势。乙烯处理可以诱导 β -Gal基因的表达, 但在乙烯跃变期该 β -Gal基因的表达量没有显著变化。因此, β -Gal被认为可能在果实后熟软化的初期阶段起作用^[19]。Sumathi等^[22]对阳桃的研究表明, 在果实成熟过程, β -GalII可以溶解和降解结构完整的果胶, 从而改变碱性水溶性半纤维素的结构, 使果实硬度下降。目前, 已经在番茄、苹果、梨、草莓等较多果实中证实了 β -Gal和XTH(木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶)与果实的成熟软化密切相关。人们还相继从草莓、脐橙、猕猴桃、桃、番木瓜、香蕉和枣等果实中克隆出与软化相关的 β -Gal基因并进行了相关的研究^[23]。

3.3 其他功能

β -Gal活性在萌发的旱金莲(*Tropaeolum majus* L.)子叶中也有报道, 并且研究发现该酶能参与体内贮藏的木葡聚糖的裂解^[24]。从鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)中分离和纯化的 β -Gal表现出较高的酶活性, 并且可用于分解牛奶中的乳糖。在豇豆、萝卜、绿豆、大麦、胡萝卜、水稻茎、羽扇豆^[25]和云豆也分离得到 β -Gal^[26-29]。此外, 在苹果、芒果、日本梨和鳄梨发现多种 β -Gal的同工酶^[23-26]。

4 β -Gal的应用

4.1 β -Gal在工业中的应用

酶是在生物体内具有多种功能的生物催化剂,

由于酶成本是决定反应过程经济性最关键的因素, 所以无论是基础研究领域还是工业应用领域, β -Gal都极具发展潜力。如在食品工业中 β -Gal可将乳糖裂解为其基本成分的冷激型 β -半乳糖。乳制品中乳清是一种含有高有机物的污染产物, 其裂解后可以作为牲畜的食物来源, 也可用于工业上开发新的不含乳糖产品。干酪乳清是另一高度污染物, 其含有0.7%(w/v)的蛋白、5%(w/v)的乳糖及93%(w/v)的水分和盐。在用 β -Gal裂解乳糖后, 该有机污染物可以作为廉价易得的微生物食物^[30]。 β -Gal可将半乳糖苷催化裂解为单糖, 利用 β -Gal裂解乳糖的作用可以为乳糖过敏人群提供低乳糖牛奶和相关奶制品^[31]。 β -Gal可直接运用于干酪乳清生成高甜度的、可作为冰激凌和甜点等添加剂的糖浆剂^[32]。因而, β -Gal在食品工业中被广泛用于提高乳制品的糖度、稳定性、风味和消化性。

4.2 在医学中的应用

据估计, 全球大约75%的成年人在其成年后乳糖酶活性有所降低。而超过70%的世界人口因小肠黏膜缺乏 β -Gal活性而患乳糖不耐症, 进而导致不能消化乳糖和含有乳糖的产品^[33]。此外, HIV感染的病人也已被证实 β -Gal活性低。乳糖吸收障碍可能是AIDS肠道表现出的症状之一。在医学上, 一种经济适用的乳糖裂解法可以解决乳糖不耐症病人出现的诸多问题, 如利用 β -Gal使乳糖酶促裂解生成葡萄糖和半乳糖^[34]。

4.3 在分析检测中的应用

生物传感器是免疫测定、毒物分析、取证、药物检测、基因表达分析、基因鉴定、农业诊断和药物基因学等诸多方面的重要工具。它可以将对生物分子的分子识别的选择性与信号传感器的敏感性相结合^[35-36]。目前, 酶、抗体、多肽、细胞和核酸等不同生物识别元件的生物传感器已被大量地开发^[35]。而牛奶及其衍生品的质量控制是一个要求严格的领域, 利用 β -Gal可以灵敏、省时且准确地对牛奶质量进行监测。

5 展望

对于植物而言, 果实的成熟、花粉的发育都是至关重要的生理过程。果实的成熟象征着生长发育的结束并伴随着种子的生成。成熟果实经历了许多生理、生化的变化, 从而引起质地、色泽、风味等

的改变。相关研究已经证实,在果实的成熟衰老过程中,细胞壁超微结构和代谢过程发生了重大变化。其中细胞壁果胶、纤维素以及半纤维素结构的改变与成熟过程中硬度的变化有关。这些变化不仅包括多糖的溶解和解聚,还包括解聚物等其他小分子的重新排列^[37-39]。近年来研究发现, β -半乳糖苷酶和木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶(XTH)是果胶和纤维素、半纤维素结构变化中重要的酶类,它们在细胞壁代谢中具有重要的功能。目前,已经在番茄、苹果、梨、草莓等较多果实中证实了 β -Gal和XTH与果实的成熟软化密切相关^[36-42]。但由于果实种类的广泛性,不难想象它们在各自代谢方式上是不同的。这些不同可以影响或反映细胞壁特定的生化变化和特定的调节基础。由于特定果实的成熟和软化可能经历很多不同的机制,因此需要针对各种不同的果实来分析这些问题,而从一个品种上得到的结果也许并不能恰当的推及到同一物种的所有品种。近年来,关于 β -Gal的研究进展迅速,但仍存在许多问题需要深入探讨,如在功能方面对 β -Gal的研究主要集中在果实成熟方面,而 β -Gal在调控花粉发育的报道相对较少。我们研究组在对白菜雄配子减数分裂的胞质分裂突变体(male meiotic cytokinesis, *mmc*)与其野生型植株花蕾差异表达的基因分析中,分离到一个 β -Gal基因,该 β -Gal在花粉发育过程中特异表达,通过反义RNA对其进行功能分析发现,该 β -Gal缺失会导致花粉发育的异常^[4],这将为研究 β -Gal在花粉发育中的功能提供新的线索。有关花粉发育机制的研究一直是国内外发育生物学领域的一个热点。尽管目前有关 β -Gal分子机制的研究信息还非常有限,但这些重要的实验结果将为阐明其作用机制提供了新的依据,并对进一步揭示其分子机制,促进 β -Gal基因相关生物学功能的研究具有重要意义。

参考文献 (References)

- Bell AN, Magill E, Hallsworth JE, Timson DJ. Effects of alcohols and compatible solutes on the activity of beta-Galactosidase. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 169: 786-94.
- 高山, 陈桂信, 许端祥, 林碧英, 林义章, 潘东明. 苦瓜果实 β -半乳糖苷酶基因的克隆表达及亚细胞定位. *植物遗传资源学报* (Gao Shan, Chen Guixin, Xu Duanxiang, Lin Biying, Lin Yizhang, Pan Dongming. Cloning expression and subcellular localization of beta galactosidase gene from momordica charantia. *Journal of Plant Genetic Resources*) 2013; 14(6): 150-5.
- Dwevedi A, Kayastha AM. A beta-galactosidase from pea seeds (Ps β -Gal): Purification, stabilization, catalytic energetics, conformational heterogeneity, and its significance. *J Agric Food Chem* 2009; 57(15): 7086-96.
- 刘金龙, 曹家树. 白菜花粉壁发育相关基因的表达分析与功能验证(博士学位论文). 浙江大学(Liu Jinlong, Cao Jiashu. Expression and functional analysis of genes related to pollen wall development in cabbage. Zhejiang University), 2013.
- Tello-Solis SR, Jimenez-Guzman J, Sarabia-Leos C, Gomez-Ruiz L, Cruz-Guerrero AE, Rodriguez-Serrano GM, *et al.* Determination of the secondary structure of *Kluyveromyces lactis* betagalactosidase by circular dichroism and its structure-activity relationship as a function of the pH. *J Agric Food Chem* 2005; 53(26): 10200-4.
- Biswas S, Kayastha AM, Seckler R. Purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14. *J Plant Physiol* 2003; 160(4): 327-37.
- Li SC, Han JW, Chen KC, Chen CS. Purification and characterization of isoforms of beta-galactosidases in mung bean seedlings. *Phytochemistry* 2001; 57(3): 349-59.
- Carrillo-López A, Cruz-Hernández A, Cárabez-Trejo A, Guevara-Lara F, Paredes-López O. Hydrolytic activity and ultrastructure in fruit skins from two prickly pear (*Opuntia* sp.) varieties during storage. *J Agric Food Chem* 2002; 50(6): 1681-5.
- Kang IK, Suh SG, Gross KC, Byun JK. N-terminal amino acid sequence of persimmon fruit beta-galactosidase. *Plant Physiol* 1994; 105(3): 975-9.
- Lazan H, Ng SY, Goh LY, Ali ZM. Papaya beta-galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiol Biochem* 2004; 42(7): 847-53.
- Trainotti L, Spinello R, Piovan A, Spolaore S, Casadoro G. beta-Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *J Exp Biol* 2001; 52(361): 1635-45.
- Smith DL, Starrett DA, Gross KC. A gene coding for tomato fruit beta-galactosidase II is expressed during fruit ripening. Cloning, characterization, and expression pattern. *Plant Physiol* 1998; 117(2): 417-23.
- Moctezuma E, Smith DL, Gross KC. Antisense suppression of a beta-galactosidase gene (TBG6) in tomato increases fruit cracking. *J Exp Bot* 2003; 54(390): 2025-33.
- Smith DL, Gross KC. A family of at least seven beta-galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiol* 2000; 123(3): 1173-83.
- Hrubá P, Honys D, Twell D, Capkova V, Tupy J. Expression of β -galactosidase and β -xylosidase genes during microspore and pollen development. *Planta* 2005; 220(6): 931-40.
- Rogers HJ, Bate N, Combe J, Sullivan J, Sweetman J, Swan C, *et al.* Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Mol Biol* 2001; 45(5): 577-85.
- Singh MB, Knox RB. Gene controlling β -galactosidase deficiency in pollen of oilseed rape. *J Hered* 1985; 76(3): 199-201.
- Pressey R. β -Galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol* 1983; 71(1): 132-5.
- Smith DL, Gross KC. A family of at least seven β -Galactosidase

- genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiol* 2000; 123(3): 1173-83.
- 20 Yoshioka H, Kashimura Y, Kaneko K. Solubilization and distribution of neutral sugar residues derived from polyuronides during the softening in apple fruit. *J Japan Soc Hort Sci* 1994; 63: 173-82.
- 21 陈昆松, 张上隆, Gavin SR. β -半乳糖苷酶基因在猕猴桃果实成熟过程的表达. *植物生理学报*(Chen Kunsong, Zhang Shanglong, Gavin SR. Expression pattern of β -galactosidase gene in ripening *Actinidiachinensis* fruit, *Acta Phytophysiol Sinica*) 2000; 26(2): 117-22.
- 22 Sumathi S, Chai SP, Mohamed AR. Utilization of palm oil as a source of renewable energy in *Malaysia*. *Renew Sust Energ Rev* 2008; 12(9): 2404-21.
- 23 Tateishi A, Inoue H, Yamaki S. Fluctuations in activities of three β -galactosidase isoforms from ripening avocado (*Persea americana*) fruit and their different activities against its cell wall polysaccharides as substrates. *J Japan Soc Hort Sci* 2001; 70: 586-92.
- 24 侯晓艺, 高 昂, 巩 江, 赵 婷, 陈巧利, 倪士峰, 等. 旱金莲药学研究概况. *辽宁中医药大学学报*(Hou Xiaoyi, Gao Ang, Gong Jiang, Zhao Ping, Chen Qiaoli, Ni Shifeng, *et al.* Overview of Pharmacological research of *tropaeolum Majus* L. *Journal of Liaoning University of TCM*) 2011; 13(4): 67-8.
- 25 李绪渊, 朱宗祯, 涂建霞, 马建泰, 孟延发. 鹰嘴豆 β -半乳糖苷酶的提取及其氨基酸组成研究. *甘肃科学学报*(Li Xuyuan, Zhu Zongzhen, Tu Weixia, Ma Jiantai, Men Yanfa. Study on extraction technology and composition of amino acids of chickpea beta galactosidase, *Journal of Gansu Sciences*) 1997; 9(2): 12-6.
- 26 Yang SL, Xu CJ, Zhang B, Li X, Chen KS. Involvement of both subgroups A and B of expansin genes in *Kiwifruit* fruit ripening. *HortSci* 2007; 42(2): 315-9.
- 27 Konno H, Katoh K. An extracellular β galactosidase secreted from cell suspension cultures of carrot: Its purification and involvement in cell wall polysaccharide hydrolysis. *Physiol Plant* 1992; 85(3): 507-14.
- 28 Konno H, Tsumuki H. Purification of a β -galactosidase from rice shoots and its involvement in hydrolysis of the natural substrate in cell walls. *Physiol Plant* 1993; 89: 40-7.
- 29 Buckeridge MS, Reid JS. Purification and properties of a novel beta-galactosidase or exo-beta-D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 1994; 192(4): 502-11.
- 30 Rech R, Ayub MA. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochem* 2007; 42(5): 873-7.
- 31 Haider T, Husain Q. β -Galactosidase by bioaffinity adsorption on immobilization of concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. *Int Dairy J* 2009; 19: 172-7.
- 32 Dominques L, Lima N, Teixeira JA. *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. *Process Biochem* 2005; 40: 1151-4.
- 33 Nogales JMR, Lopez AD. A novel approach to develop β -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. *Int Dairy J* 2006; 16: 354-60.
- 34 Sener N, Apar DK, Ozbek B. A modeling study on lactose hydrolysis and β galactosidase stability under sonication. *Process Biochem* 2006; 41: 1493-500.
- 35 Rogers KR. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Anal Chim Acta* 2006; 568(1/2): 222-31.
- 36 Levicky R, Horgan A. Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies. *Trends Biotechnol* 2005; 23(3): 143-9.
- 37 Li X, Zhou QZ, Chen XD. Pilot-scale lactose hydrolysis using β -galactosidase immobilized on cotton fabric. *Chem Eng Process: Process Intensification* 2007; 46(5): 497-500.
- 38 Cieslinski H, Kur J, Bialkowska A, Baran I, Makowski K, Turkiewicz M. Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted beta-galactosidase from antarctic bacterium *Pseudo alteromonas* sp. 22b. *Protein Expres Purif* 2005; 39(1): 27-34.
- 39 Gonzalez CP, Castilla A, Garofalo L, Soule S, Irazoqui G, Giacomini C. Enzymatic synthesis of 2-aminoethyl beta-D-galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase. *Carbohyd Res* 2013; 368: 104-10.
- 40 李东霄, 邓小莉, 冯素伟, 徐龙龙, 茹振钢. 温敏核不育小麦可育和败育花粉的超微结构观察. *中国细胞生物学学报*(Li Dongxiao, Deng Xiaoli, Feng Suwei, Xu Longlong, Ru Zhengang. Ultrastructural observation of fertile and sterile pollen grains of a thermo-sensitive genic male-sterile wheat. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(8): 1119-25.
- 41 Wilson J. Milk intolerance: Lactose intolerance and cow's milk protein allergy. *Newborn Infant Nurs Rev* 2005; 5(4): 203-7.
- 42 Haider T, Husain Q. Concanavalin A layered calcium alginate-starch beads immobilized beta galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. *Int J Pharm* 2008; 359(1/2): 1-6.