

乳糖酶的应用及发展现状

王 敏 檀建新 张 伟 李长文 马 雯 路玲玲

(河北农业大学食品科技学院,保定 071001)

摘 要 对水解酶- β -半乳糖苷酶的酶源、特性、体内代谢作简要介绍,同时讨论了固定化技术、基因工程技术生产乳糖酶的发展现状。

关键词 乳糖不耐受 乳糖酶 固定化 基因工程

牛乳和乳清中含有大量乳糖,它是乳制品中主要碳水化合物。但是世界上很多人(约 70%)因乳糖酶缺乏和乳糖不耐受(lactose intolerance)而影响乳制品的摄入^[1]。

1889 年,荷兰生物学家 Beijerinck 第一次报道了乳糖酶可水解乳糖^[2],目前商品化的乳糖酶上市,所以对于乳糖不耐受可以通过药物或食疗来减轻症状,提高乳糖的消化吸收率;另外,随着生物技术的迅速发展,使得利用生物反应器来改进牛奶成分成为可能,本文就乳糖酶在食品工业中的应用作简要论述。

1 乳糖酶的微生物酶源、特性及体内调控

乳糖是存在于哺乳动物乳汁中的一种双糖,甜度和溶解度均较低,且在小肠里不能直接吸收,所以必须通过小肠内乳糖酶水解才能被人体消化吸收。当饮食中有乳糖时,可提高机体对 Ca、P、Mg 等必需微量元素的吸收。 β -D-半乳糖苷酶(E.C.3.2.1.23, β -D-galactosidase)又称乳糖酶(lactase),是一种无味、无臭,溶解后呈浅棕色液体,且无毒无副作用的生物酶制剂,该酶可用于降解乳糖为半乳糖和葡萄糖,亦具有半乳糖苷的转移作用。半乳糖参与脑组织的构成,是婴幼儿脑发育的必需物质,与婴儿大脑的迅速成长有密切关系。乳糖酶存在于扁桃、杏等植物及幼小哺乳动物的小肠中,细菌、霉菌和酵母等

微生物经发酵亦可产生乳糖酶。其中细菌中的乳酸菌、环状芽孢杆菌、大肠杆菌、嗜热链球菌、产气肠细菌等;霉菌中的米曲霉、黑曲霉、硫球曲霉、黄青霉、炭色曲霉等;酵母中的脆壁克鲁维酵母和乳酸克鲁维酵母、热带假丝酵母等;放线菌中的天蓝色链霉菌等均产 β -半乳糖苷酶。目前商业用酶源一般认为酵母(如乳酸克鲁维酵母、脆壁克鲁维酵母)最为安全,另一种为黑曲霉^[3~5]。

乳糖酶根据不同来源可分为胞内酶或胞外酶,如乳酸酵母、黑曲霉、米曲霉、米根酶等产乳糖酶均为胞外酶,脆壁克鲁维酵母和大部分细菌产胞内酶。霉菌作用最适 pH 偏酸性(pH 2.5~5.0),酵母和细菌所产乳糖酶最适 pH 近中性(分别为 pH 6~7 和 pH 6.5~7.5)。因此最适 pH 决定了各自的用途,如霉菌所产乳糖酶使用于酸性乳清和干酪的水解(含大量乳糖),酵母和细菌乳糖酶适于牛乳(pH 6.6)和鲜乳清(pH 6.1)的水解。微生物乳糖酶最适作用温度范围较宽,酵母乳糖酶作用温度在 35℃ 左右,而霉菌最适作用温度一般在 50℃ 以上,最高可达 60℃,环状芽孢杆菌则可达 65℃,嗜热水生菌则为 80℃,耐高温微生物菌株使用时可避免杂菌污染。

大肠杆菌乳糖酶分子质量最大为 520~850 ku,亦有报道为 500~520 ku。Takatoshi itoh 等报道 4 株产乳糖酵母菌 *Tolulopsis versatilis* M6, *Tululopsis sphaerica* J28, *Canadida pseudotropicalis* B57, *Canadia*

psedotopicalis A60 分子质量分别为 226, 233 200 215 kDa^[6]。米曲霉乳糖酶分子质量为 130 ku。嗜热厌氧细菌乳糖酶分子量为 154 ku。

2 乳糖酶的体内代谢

流行病学研究表明全世界(除高加索人)均存在不同程度的乳糖酶缺乏,而且存在种族差异,以亚洲人情况最严重,发生率约为 75%~100% 人,北美黑人 70%~75%,北美白人 10%~15%。

2.1 正常人体内乳糖代谢

乳糖有半乳糖和葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成。乳糖进入人体后首先被小肠中的乳糖酶分解为葡萄糖和半乳糖再被小肠吸收。半乳糖比葡萄糖吸收速度更快,两者吸收系数分别为 122 和 100。葡萄糖进入体内的葡萄糖池而被利用,半乳糖主要是在肝脏中转化成葡萄糖。对此代谢途径起调节作用的是尿苷二磷酸半乳糖-4-表异构酶。正常情况下有 94% 半乳糖通过这条途径代谢,除此以外亦可由红细胞代谢或由尿中排除。

2.2 在乳糖酶缺乏者体内的代谢

乳糖进入乳糖酶缺乏(lactase deficiency)者体内后因乳糖酶活性低或缺乏,大部分不能在小肠分解,进入结肠后被肠道细菌分解而产生甲酸等短链脂肪酸和 CO_2 、 CH_4 等气体,所产生的低分子物质高渗作用使肠道内水分增加,从而引起肠鸣、腹胀等症状^[7]。

3 乳糖酶的应用与发展现状

目前对于它的研究热点主要集中在固定化、生产低聚糖和使用基因工程技术生产乳糖酶方面。

3.1 乳糖酶的固定化技术研究

对于大规模工业生产来说,虽然游离乳糖酶水解乳糖工艺简单,但是因为添加乳糖酶会使牛奶掺入外来蛋白质,另外乳糖不耐受症患者又不喜欢乳糖酶分解乳糖后导致甜味增加。而固定化酶则可以避免这些问题,

固定化方法很多,主要有吸附法、包埋法、结合法、交联法、和热处理等方法^[8]。

3.1.1 包埋法

Kwak 报道用脂肪酸脂(中链三酰甘油脂 MCT 和聚硬脂酸甘油脂 PGMS)作为载体生产微胶囊乳糖酶。实验中将酶液先与 PGMS 和 MCT 按比例混匀,后将其在 45℃ 以喷雾形式加入 5℃ 的吐温-60 溶液中,离心得到半透膜包埋的微胶囊乳糖酶。实验表明 PGMS、MCT 以 15:1 比例包埋乳糖酶效果理想^[9]。

Raddr 报道用 DRV 和 REV 脂质作为半透膜包埋乳糖酶,酶源为曲霉。半透膜包埋法受缓冲液浓度、pH 值和包被物质及其比例等因素影响。用 DRV 作为载体的乳糖酶在 4℃ 保存结果表明 10 d 内 20%,保存 20 d 则分解 65%,而用 REV 作为载体包埋的乳糖酶在相同条件下水解牛奶中乳糖,在 20 天贮期内只分解 20%,并且 2 种胶囊化乳糖酶在 4℃ 20 d 贮期内酶活下降不明显,pH4.0 最稳定。在模拟胃肠条件的实验中胶囊化的乳糖酶分解乳糖量明显增加。这说明在酸性消化液中胶囊化乳糖酶可以被释放出来^[10]。

Osanmu 等报道用聚乙烯醇水凝胶(PVA)固定大肠杆菌(*E. coli*)的乳糖酶。该本实验中主要考察了硼酸浓度和处理时间对固定化酶稳定性的影响。因为硼酸可以促进 PVA 间的交联,可以阻止酶在包埋过程中的渗漏。实验结果表明以 2% 硼酸处理 10 min 的 PAV 作为载体包埋乳糖酶为最佳条件^[11]。

3.1.2 交联法

Quinn 等用铅板作为酶的载体,因铅板具有较高的空隙度,较高的机械强度、较好的稳定性和安全性。为了将酶固定在铅板上,可将铅板浸在酶液中,在室温下用一夜时间完成酶、戊二醛、牛血清蛋白间的交联过程。在 4℃ 冷藏贮 30 d,以 ONPG 为底物测定乳糖酶的活性,30 d 后其钝化率为 86%,而温度对酶活影响的研究结果表明,该酶在 45℃

不稳定,37℃ 稳定。通过交联法将酶固定在铅板的表面,在生产条件下对于转化乳糖具有很好的活性和稳定性^[12]。

3.1.3 吸附法

Ladero 报道采用硅-氧化铝作为固定化酶的载体,酶源为脆壁克鲁维酵母。实验表明该酶水解乳糖和 ONPG 的最适 pH 值为 7,经固定化后最适 pH 无变化。在 pH5~9 磷酸缓冲液间考察固定化酶与游离酶的稳定性发现固定化酶在酸性条件下稳定,而游离酶在碱条件下稳定,其原因可能是固定化过程中酶表面的氨基被载体表面的醛基所取代。酶浓度在 0.35mg/g,粒径在(100~200 μm)较好,对于水解乳糖固定化酶最高为 40℃,最低为 5℃。另外固定化酶还可用于冷冻乳制品中,以避免乳糖结晶,并且固定化酶的酶活比游离酶的酶活高 50%^[13]。

3.1.4 结合法

MARIA J 等报道用活性环氧丙烯颗粒固定酶,酶源为 *B. circulans*。先将 Eupergit C 活化(主要是为了引入与酶反映的活性基因)。当酶与聚合物比例为 1:20 时,Eupergit C 与酶 100% 形成共价键。若将酶量增加 20% 则呈下降趋势。从 *B. circulans* 分离出的乳糖酶最适 pH6.5~7.5,但是固定化酶在 pH7.5~8.5 间活力便开始下降,所以选取 pH=7.5,10 h,1 mol/L K_3PO_4 作为固定化的最适条件。固定化酶在 4℃ 存放 4 个月酶活损失<4%。市售游离酶在 30℃ 时,250 min 后保存 25% 的酶活,而经固定化酶在 30℃ 则保留 75% 的酶活^[14]。

3.2 基因工程技术在乳糖生产中的应用

基因工程技术,对于乳糖酶的生产可以将活性高的乳糖酶基因导入易于培养、生长繁殖迅速的微生物体内,从而大大降低成本。如 Domingues 报道利用絮状酿酒酵母和黑曲霉中含有编码分泌胞外乳糖酶的 *lacA* 基因构建重组菌株,使重组酿酒酵母菌株能够分泌乳糖酶,且该乳糖酶可以高效利用乳糖^[19]。为提高酶的产量和质量,常采用定点

诱变、原生质体融合和 DNA 重组技术。如 Ibrahim 使用化学诱变剂对 2 株双歧杆菌、乳酸杆菌和嗜热链球菌进行诱变,然后筛选高产菌株。通过与其各自野生型菌株相比,诱变后菌株产酶量明显增加,长双歧的诱变菌株产酶量比野生型增加 2 倍多^[20]。为了进一步获得高产菌株,新的基因工程菌不断出现。生产酶的工程菌以大肠杆菌、酵母菌为主,此外还有嗜热链球菌、乳杆菌等^[21]。我国科学家已经运用现代生物技术开发出了一种新乳糖酶,并建构出一种具有“真核生物反应器”功能和特点的“工程酵母”(*Pichia Pastoris*)。其外源新乳糖酶基因在毕赤酵母中得到高效表达,其表达产物分泌于胞外,产量达到 6 g/L,乳糖酶新基因于宿主酵母菌中的表达产物乳糖酶的活性为 3 600 u/L,比目前国际上报道的“工程米曲霉”最高表达产量高出 6 倍。

3.3 乳糖酶用于生产低聚糖

乳糖酶通过转糖苷作用生成低聚糖,如低聚半乳糖、异乳糖等,有报道从 *B. circulans* 中分离得到的乳糖酶在分解乳糖时发生转糖苷作用可以形成 11 种低聚糖,且酶源不同形成的低聚糖亦不同^[15]。转糖苷作用生成的低聚半乳糖几乎不被小肠消化,是一种低分子量、不粘稠的水溶性膳食纤维。它作为肠道内双歧杆菌的增殖因子,只能为双歧杆菌所利用,而不能被肠道内腐败细菌所利用,增殖的双歧杆菌竞争性地拮抗腐败菌如产气荚膜梭菌的生长,减少有害毒素物质的产生,防止便秘和腹泻,有整肠效果。与此相关还有抗癌、降血压、增强肝功能及促进 Ca 吸收等作用。与一般膳食纤维比 GOS 对酸稳定,有良好的保温性,不会束缚金属离子,易于添加到食品和饮料中^[16]。用于生产低聚糖的酶源有米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、乳酸克鲁维酶母(*Kluyveromyces lactis*)、脆壁克鲁维酶母(*Kluyveromyces fragilis*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)^[17~18]。

3.4 乳糖酶在乳品工业中的应用

乳糖酶用于乳品生产低乳糖制品在国外品种较多,如乳糖水解奶、低乳糖奶粉、奶酪、冰激凌。经过水解的牛奶具有以下特点:增加滋味,明显提高奶香,改善口感等。甜度比水解的提高3倍。主要时因为水解后乳糖生成 α -D-葡萄糖和 β -D-半乳糖。 α -D-葡萄糖是人体各部分代谢的能量来源; β -D-半乳糖是人体大脑和黏膜组织代谢时必需的结构糖;此外还产生8%左右低聚糖。另外还用于生产干酪、奶粉等方面。

冷冻乳制品甜点如冰激凌、速冻酸乳酪比其他乳制品含有活的乳酸菌,保存时间更长,同时活的乳酸菌一方面在发酵时消耗一部分乳糖,另一方面又能产生乳糖酶,从而减轻乳糖不耐受症状。因为冷冻可以保护某些类型的乳酸菌。有实验报道胞外多糖可以提高冷冻乳制甜点中乳酸菌的成活率,但是冷冻条件又易使细胞膜透性增大、使分子脱水而使细胞失活。保加利亚乳酸杆菌和嗜热链球菌产生胞外多糖,这层较松散的粘液可作为稳定剂来防止脱水收缩和结晶,从而避免因温度下降和震荡造成的酸乳凝块^[22]。

随着对乳制品营养作用的认识逐渐提高和对微生物乳糖酶的深入研究,人类乳糖不耐受和营养状况会逐渐得到改善,而乳糖酶应用领域也会越来越广泛。

参 考 文 献

- 高焕明. 中国乳品工业, 1996, 14(3):19-21.
- Rouwenhorst R J, Pronk J T, van Dijken J P. TIBS, 1989, 14(10):416-418.
- Ganeva V, Galutsov B, Eynard N. Appl Microbiol biotechnol 2001, 56:411-413.
- Zairossani M N, Melih I F, Mehrab M. Biotechnology Letters 2001, 23:845-849.
- Becerra M, Diaz prado S, Gronzalez M I et al. Protein Engineering 2001, 14(5):379-386.
- Takatoshi Itoh, Masaru Suzuki, Susumu Adachi. Agric. biol. chem, 1982, 46(4):899-904.
- 钟燕. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(3):168-171.
- 郭勇. 酶工程. 北京:中国轻工业出版社, 1994, 151-152.
- Kwak H S, Ihm M R, Ahn J. Journal of Dairy Science 2001, 84:1576-1582.
- Rao D R, Chawan C B, Veeramachaneni R. Journal of Food Biochemistry, 1995, 18:239-251.
- Oasmu A, TATEKI Y, Hitoshi OSHI F, et al. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1989, 64(4):293-295.
- Quinn Z K, Zhou, Xiao Dong Chen. Journal of food engineering 2001, 48:69-74.
- Ladero M, Santos A, Garcia-Ochoa F. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(8):583-592.
- Maria J Hernaiz, David H G. Enzyme and Microbial Technology 2000, 27(1/2):26-32.
- Shuichi Yanahira, Tomoko Kobayashi et al. Bioscience, Biotech. Biochem, 1995, 59(6):1021-1026.
- 秦燕, 宁正祥, 胡新宇. 广东药学院学报, 2001, 17(2):83-86.
- Boon M A, Janssen A E M, Vant Riet K. Enzyme and microbial technology. 2000, 26:271-281.
- Mervat I Foda, M Lopez-Leiva. Process Biochemistry 2000, 35(6):518-587.
- Domingues L, Onnela M L, Teixeira J A et al. Appl Microbiol Biotechnol 2000, 1:97-103.
- Ibrahim S A, Osullivan D J. J. Dairy Sci 2000, 83:923-930.
- 吕晓华, 刘世贵, 高荣. 中国乳品工业, 2002, 30(1):44-47.
- Sung H H, Robert T. M. Journal of Dairy Science 2001, 84:1367-1374.

Charaction of Lactase and the Development of Its Application

Wang Min Tan Jianxin Zhang Wei

Li Changwen Ma Wen Lu Lingling

(College of Food Science and Technology, Agriculture University of Hebei, Baoding, 071001)

ABSTRACT In this paper, lactase from different microbes and their metabolism in the body were reviewed. The technology of immobilization and gene engineering were also introduced.

Kwy words lactase intolerance, β -galactosidase, immobilization, gene engineering