

应用重组乳糖酶 LacLM 生产无乳糖奶的研究*

潘渠^{1,2}, 李晋川², 王竞¹, 谭银玲¹, 朱晓燕¹, 陈志谨¹, 胡福泉¹

1(第三军医大学基础部微生物学教研室, 重庆, 400038)

2(成都医学院病原教研室, 四川 成都, 610083)

摘要 为明确由第三军医大学基础部微生物学教研室研发的重组乳糖酶 LacLM 的工业价值和应用方式, 采用葡萄糖氧化法(GOD/POD)测定了该酶水解乳糖的酶学特性, 以及对牛奶中所含乳糖的水解率。实验测得该酶对乳糖的 K_m 和 V_{max} 值分别是 $13.9 \pm 1.05 \text{ mM}$ 和 $14.1 \pm 0.31 \mu\text{mol glucose}/(\text{min} \cdot \text{mg}) \text{ protein}$ 。该酶水解乳糖的最适温度和 pH 分别为 37°C 和 7。在 10°C 下每升牛奶加入 40 mg 酶可以在 12 h 内完全水解牛奶中的乳糖; 在 25°C 下每升牛奶加入 5 mg 酶可以在 18 h 内完全水解牛奶中的乳糖; 在 37°C 下添加 2.5 mg 酶就能在 10 h 内完全水解牛奶中的乳糖。试验结果表明, 重组乳糖酶 LacLM 可以直接加入牛奶中, 在低温或常温下去除牛奶中的乳糖, 适用于无乳糖奶的工业化生产。

关键词 重组乳糖酶 LacLM, 牛奶, 无乳糖奶, 乳糖不耐受

中国人, 乃至整个亚洲人广泛存在乳糖酶缺乏症, 这个比例在汉族中约占总人口的 75% ~ 95.7%^[1,2]。乳糖酶缺乏导致的乳糖不耐受使一部分人不适宜饮用牛奶, 无法利用牛奶中优良的蛋白质和钙质营养^[3-5]。为解决这个矛盾, 在牛奶中添加乳糖酶, 替代人体的乳糖酶预先水解牛奶中的乳糖是一个可行的办法。乳糖水解后变成半乳糖和葡萄糖, 既避免了乳糖不耐受的可能, 又使乳糖变成了人体可直接吸收的营养, 还增加了牛奶的甜度。目前中国市场上已经有这样的产品问世, 例如营养舒化奶。但是目前国内还没有能形成工业化生产的乳糖酶产品。生产营养舒化奶的乳糖酶购自荷兰帝斯曼公司, 商品名为 Maxilact, 它是从乳制品酵母——乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)中分离出来的。

在之前的研究中, 作者从乳制品和人体肠道中的益生菌——嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356)中克隆表达了乳糖酶 LacLM, 获得了大量表达, 并成功地进行了分离纯化。以邻硝基苯基半乳糖(ONPG)为底物的测试表明, 该酶可能可以作为水解牛奶中乳糖的工业添加剂使用^[6]。

本文以乳糖为底物测定了该重组乳糖酶水解乳糖的酶学特征, 并将其添加到牛奶中, 测得该重组酶在各温度下水解牛奶中乳糖的效率和用量, 试验表明, 该酶能高效水解牛奶中的乳糖, 具有工业应用价值。

第一作者: 博士研究生, 讲师(胡福泉教授为通讯作者)。

四川省科技攻关项目(05SG022-019)

收稿日期: 2009-01-22, 改回日期: 2009-03-09

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

重组乳糖酶 LacLM 纯化制剂(0.5 mg/mL), 由第三军医大学微生物教研室制备。Smart Spec 3000 分光光度计购自美国 Bio-Rad 公司; 乳糖购自 Sigma 公司。试验用牛奶为重庆天友乳业生产的超高温瞬时灭菌(UHT)纯牛奶。(GOD/POD)氧化法葡萄糖测定试剂盒购自 Leadman BioTech 公司。 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 和 ZnSO_4 购自上海生工公司。

1.2 最适温度和 pH 值的测定

酶活性测定方法根据文献^[7]修改: 将 $0.2 \mu\text{g}$ 重组乳糖酶 LacLM 加入到 $50 \mu\text{L}$ 乳糖溶液(含质量浓度为 4.6% 的乳糖, 50 mmol/L Na_2PO_4 , pH 6.6)中, 分别在设定温度 4°C 、 10°C 、 20°C 、 30°C 、 37°C 、 52°C 、 60°C 和 70°C 下反应 1 h, 然后沸水浴 5 min 使酶变性以终止乳糖水解反应。取 $3 \mu\text{L}$ 上述反应液加入到 $300 \mu\text{L}$ 葡萄糖测定试剂盒工作液中, 37°C 水浴 500 s, 最后在 520 nm 处测定 OD 值, 该值代表乳糖水解后生成的葡萄糖的浓度。OD 值最大处的温度为该酶的最适温度。

配制 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5、6.5、7.5 和 8 的质量浓度为 4.6% 的乳糖溶液。pH 值为 4.5、5.0 和 5.5 的乳糖溶液以 50 mmol/L 的乙酸和乙酸钠为缓冲体系; pH 值为 6.5、7.5 和 8 的乳糖溶液以 50 mmol/L 的磷酸钠为缓冲体系。取上述乳糖溶液各 $50 \mu\text{L}$, 分别加入 $0.2 \mu\text{g}$ 重组酶 LacLM, 经过如同测定最适温度的反应后, 测定 OD 值, 最大值处

的 pH 为该酶的最适 pH。

1.3 酶动力学参数测定

将乳糖溶液 (400 mmol/L 乳糖, 50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7) 用溶液 (50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7) 系列稀释为乳糖浓度分别为: 12、20、32、40、52、100、200 和 400 mmol/L 的反应溶液。取反应溶液各 50 μL , 加入 0.2 μg 重组酶 LacLM, 在最适温度下反应后测定 OD 值。用葡萄糖测定试剂盒测定已知浓度的葡萄糖溶液的 OD 值, 并作标准工作曲线, 以换算为葡萄糖浓度。设定在该反应条件下每分钟生成 1 μmol 葡萄糖为 1 个酶活性单位 (U)。测得各浓度底物的反应速度后, 将测得数据根据经移项整理后的米氏方程 $V = V_{\max} - K_m V/[S]$ 处理, 利用 SPSS 13.0 统计分析软件进行线性回归, 计算酶动力学参数 V_{\max} 和 K_m 值。

1.4 乳糖水解率测定

取无菌乳糖溶液 (质量浓度为 4.6% 的乳糖, 50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7) 50 μL , 加入 1 μg 重组酶 LacLM, 在 10 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 24 h, 按上述方法测定 OD 值, 并计算乳糖水解率。

1.5 乳糖酶 LacLM 水解牛奶中乳糖的水解率测定

测定方法根据文献^[8]修改: 取乳糖质量浓度为 4.6% 的纯牛乳 1 mL, 分别加入酶 1、2.5、5、10、20 和

40 μg , 分别置于 10 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1~60 h。试验用牛奶和重组乳糖酶 LacLM 制剂均为无菌级, 操作在无菌工作台上进行。然后加入 200 μL 的 5% ZnSO_4 溶液和 200 μL 的 4% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液, 终止水解反应和沉淀牛乳中的蛋白质。然后于 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液用葡萄糖测定试剂盒测定乳糖水解率。

2 结果与讨论

2.1 重组乳糖酶 LacLM 的最适温度和 pH

重组乳糖酶 LacLM 水解乳糖的最适 pH 为 7 (图 1 左图), 在 pH 6.5~7.5 能保持 70% 以上的活性, 在 pH < 5.5 时还残余 6% 的酶活性, 但是当 pH 降低至 5 以下时则活性全失。牛奶的 pH 值为中性, 适合该酶发挥乳糖水解活性。

重组乳糖酶 LacLM 水解乳糖的最适温度是 37 $^{\circ}\text{C}$ (图 1 右图), 52 $^{\circ}\text{C}$ 时仍能保持 93% 的活性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 还能剩余 10% 的活性, 70 $^{\circ}\text{C}$ 时活性全失。在低温下, 该酶也有残余活性, 例如在 4 $^{\circ}\text{C}$ 时能表现出 2.4% 的活性, 在 10 $^{\circ}\text{C}$ 时能表现 8.4% 的活性, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 表现 27% 的活性。生产企业可以利用该酶的低温残留活性, 在低温和常温下水解牛乳中的乳糖。

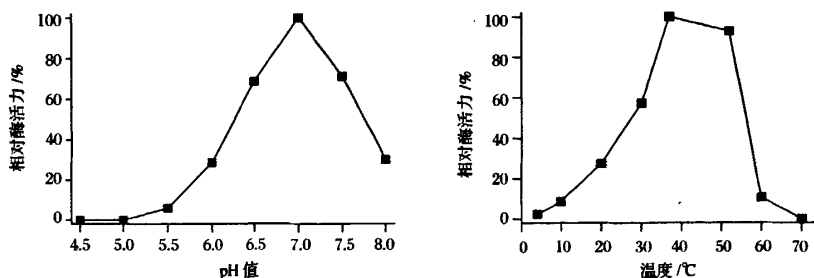


图 1 重组乳糖酶 LacLM 水解乳糖的最适温度和 pH 的测定图

2.2 重组乳糖酶 LacLM 的酶动力学参数

如图 2 所示, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 pH 7 的反应条件下, 测得重组乳糖酶 LacLM 对乳糖的 K_m 值和 V_{\max} 分别是 $13.9 \pm 1.05 \text{ mM}$ 和 $14.1 \pm 0.31 (\text{mol glucose} / (\text{min} \cdot \text{mg}) \text{ protein})$ 。当乳糖溶液浓度为 200 mmol/L 时, 测得重组乳糖酶 LacLM 在该反应条件下对乳糖水解的比活力为 13.4 U/mg (蛋白质)。 K_m 值是指示酶对底物亲和力的常数, 越低表示催化效率越高。豌豆乳糖酶的 K_m 值为 4.11 mM^[9], 巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*) 乳糖酶的 K_m 值为 12.6 mM^[10], 节杆菌 (*Arthrobacter psychrolactophilus*) 乳糖酶的 K_m 值为

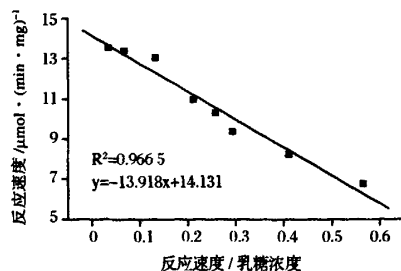


图 2 重组乳糖酶 LacLM 水解乳糖的酶动力曲线图
42.1 mM^[11], 酵母乳糖酶的 K_m 值为 50.5 mM^[12]。比较而言, 重组乳糖酶 LacLM 的 K_m 值较小, 对乳糖

水解反应有较高的催化效率。

2.3 重组乳糖酶 LacLM 对牛奶中乳糖的水解率

在 37 ℃ 下,重组乳糖酶 LacLM 对牛奶中乳糖的水解效率是最好的(图 3),即使在每升牛奶中只加入 1 mg 酶也能在 30 h 内完全水解牛奶中的乳糖;如果加入 2.5 mg 酶则乳糖完全水解的时间缩短为 10 h 左右;如果加入 10 mg 酶则乳糖完全水解可缩短至 2.5 h。

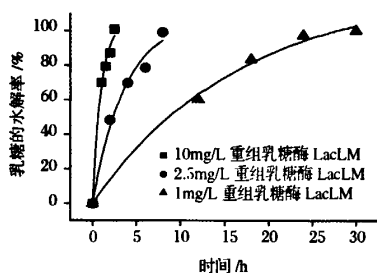


图 3 37 ℃ 下,重组乳糖酶 LacLM 水解牛奶中乳糖的水解率

在 25 ℃ 下,每升牛奶中加入 10 mg 重组乳糖酶 LacLM,乳糖可在 6 h 内被完全水解;加入 5 mg 酶则乳糖完全水解的时间延长为 18 h;加入 2.5 mg 酶则乳糖完全水解的时间进一步延长为 30 h(图 4)。

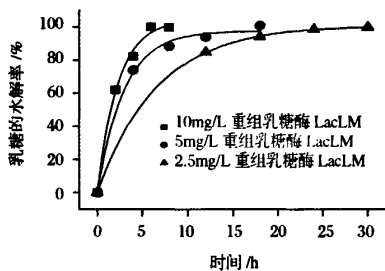


图 4 25 ℃ 下,重组乳糖酶 LacLM 水解牛奶中乳糖的效率

在 10 ℃ 下,每升牛奶中加入 40 mg 重组乳糖酶 LacLM,牛奶中的乳糖能在 12 h 内完全水解;只加入 10 mg 酶则需要 36 h 以上才能完全水解牛奶中的乳糖;加入 20 mg 酶则乳糖完全水解的时间为 24 h(图 5)。而在同样温度下,每升质量浓度为 4.6% 的乳糖溶液添加 20 mg 酶,反应 24 h 后,乳糖水解率仅为 49%。这说明该酶在牛奶中表现出更高的活性,可能牛奶中所含的某些离子能增强该酶的水解活性。

随着温度的降低,酶完全水解牛奶中乳糖所需时间也延长。在每升牛奶中添加 10 mg 重组乳糖酶 LacLM,37 ℃ 下,乳糖完全水解的时间为 2.5 h;25 ℃

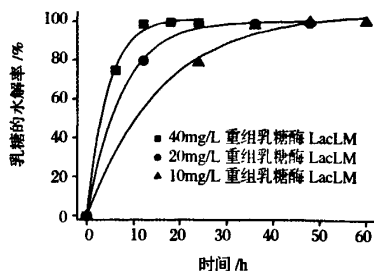


图 5 10 ℃ 下,重组乳糖酶 LacLM 水解牛奶中乳糖的效率

下,需要 6 h;而在 10 ℃ 下,则需要 36 h(图 6)。添加重组乳糖酶 LacLM 处理后的牛奶,色泽同处理前(乳白色),没有出现褐变。

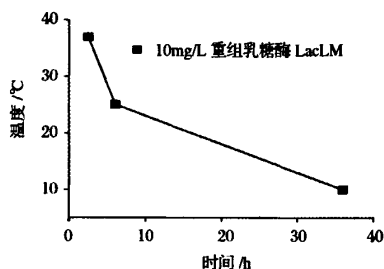


图 6 每升牛奶中添加 10 mg LacLM 时,乳糖完全水解所需时间和温度的关系图

根据实验结果,企业可以采用无菌添加技术将该酶添加到经过瞬时高温灭菌的纯牛奶中,无菌包装后,在仓库中常温储存一段时间,就可以去除牛奶中的乳糖,生产出无乳糖奶。储存时间由加入重组乳糖酶 LacLM 的量和温度决定。夏季气温高,可以少加酶;冬季需加大酶的用量;如果气温低于 10 ℃,则需要将仓库温度提高到 10 ℃ 以上。还可以在牛奶灭菌前加入该酶,控制反应温度为 10 ~ 15 ℃ 或 50 ~ 55 ℃ 的高温,在此温度下细菌基本不能生长,乳糖水解完成后,再将产品灭菌分装。

3 结论与展望

乳糖酶 LacLM 是嗜酸乳杆菌水解乳糖的关键酶^[13]。实验结果表明,重组乳糖酶 LacLM 能够在低温和常温下完全水解牛奶中的乳糖。比较荷兰帝斯曼公司的产品 Maxilact,重组乳糖酶 LacLM 具有添加量少,作用温度范围广,不引起牛奶褐变的优点。因而该酶在生产无乳糖或低乳糖奶制品上有良好的应用前景。另外该酶的大量获得和纯化方案已建立。如果要投入工业化生产,只需在考虑生产成本的前提

下,放大到工业化规模即可。重组乳糖酶 LacLM 作为具有自主知识产权的乳糖酶产品,它的工业化生产将打破外国公司垄断,为本国国民健康做出贡献。

参 考 文 献

- 1 Jarvis JK, Miller GD. Overcoming the barrier of lactose intolerance to reduce health disparities[J]. J Natl Med Assoc, 2002, 94(2):55~66
- 2 乔蓉,黄承钰,曾果,等. 粪便乳糖检测法在乳糖酶缺乏者筛选中的应用[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(2):112
- 3 余清, 荫士安. 有关乳糖不耐受的研究进展[J]. 卫生研究, 2006, 35(3):360~362
- 4 王 敏, 檀建新, 张 伟, 等. 乳糖酶的应用及发展现状[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(11):89~92
- 5 杨月欣, 程五凤. 中国儿童乳糖不耐受发生率的调查研究[J]. 卫生研究, 1999, 28(1):44~46
- 6 潘渠, 李晋川, 丛延广, 等. 嗜酸乳酸杆菌 ATCC 4356 菌株异源二聚体 β -半乳糖苷酶的克隆表达[J]. 微生物学报, 2008, 48(10):1339~1343
- 7 Nguyen TH, Splechtna B, Yamabhai M, et al. Cloning and expression of the beta-galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*[J]. J Biotechnol, 2007, 129(4):581~591
- 8 Yuan T, Yang P, Wang Y, et al. Heterologous expression of a gene encoding a thermostable beta-galactosidase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*[J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(2):343~348
- 9 Dwevedi A, Kayastha AM. Stabilization of β -galactosidase (from Peas) by Immobilization onto Amberlite MB-150 Beads and Its Application in Lactose Hydrolysis[J]. J Agric Food Chem, 2009
- 10 Li Y, Wang H, Lu L, et al. Purification and Characterization of a Novel beta-Galactosidase with Transglycosylation Activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008
- 11 Nakagawa T, Ikehata R, Myoda T, et al. Overexpression and functional analysis of cold-active beta-galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2[J]. Protein Expr Purif, 2007, 54(2):295~299
- 12 Nakagawa T, Ikehata R, Uchino M, et al. Cold-active acid beta-galactosidase activity of isolated psychrophilic-basidiomycetous yeast *Guehomycetes pullulans*[J]. Microbiol Res, 2006, 161(1):75~79
- 13 Russell W M, Klaenhammer T R. Efficient System for Directed Integration into the *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri* Chromosomes via Homologous Recombination[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(9):4361~4364

Manufacturing Research of Lactose-free Milk by Recombinant Lactase LacLM

Pan Qu^{1,2}, Li Jinchuan², Wang Jing¹, Tan Yinling¹,
Zhu Xiaoyan¹, Chen Zhijin¹, Hu Fuquan¹

1(Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

2(Department of Microbiology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT In order to clarify industrial value of the recombinant lactase LacLM researched and developed in our laboratory, the enzymatic properties of the enzyme for the hydrolysis of lactose and the hydrolysis rate of lactose in milk was determined colorimetrically using the GOD/POD assay. The optimum temperature of recombinant lactase LacLM activity was 37 °C (1 h assay) and the optimum pH was 7 for the lactose hydrolysis. The K_m and V_{max} values for lactose were 13.9 ± 1.05 mM and 14.1 ± 0.31 μ mol glucose released per min per mg protein, respectively. 100 % of lactose in UHT milk was hydrolyzed following separated treatment with 40 mg/L LacLM over 12 h at 10 °C, with 5 mg/L LacLM over 18 h at 25 °C or with 2.5 mg/L LacLM over 10 h at 37 °C. The results suggest that the recombinant lactase LacLM can hydrolyze lactose of milk at low temperature or room temperature and can be applied to manufacture lactose-free milk or low-lactose milk.

Key words recombinant lactase LacLM, milk, lactose-free milk, lactose intolerance