

渗透性 *K.lactis* 细胞内乳糖酶水解牛乳中乳糖的研究

李素芬¹, 陈占洲¹, 刘建福², 陈庆森²

(1. 河北工程大学农学院, 河北 邯郸 056001;

2. 天津食品生物技术重点实验室, 天津商学院生物工程系, 天津 300134)

摘 要: 应用填充床细胞反应器, 以渗透性 *K. lactis* 细胞内乳糖酶连续催化牛乳中乳糖的水解。渗透性 *K. lactis* 细胞内乳糖酶的热失活遵循一级反应动力学, 40℃时酶的半衰期为 9.5h, 表观米氏常数为 0.39mmol/ml, 最大反应速率 V_{max} 为 0.188mmol/min。在 2.6cm×50cm 填充床生物反应器上, 渗透性 *K. lactis* 细胞内乳糖酶催化牛乳中乳糖水解的适宜体积流速为 1.0ml/min, 酶反应的适宜温度 40℃, 反应速率达到动态平衡后生成的葡萄糖的质量浓度为 45.2mg/ml, 牛乳中乳糖的水解率为 91.3%。

关键词: 填充床反应器; 渗透性 *K. lactis* 细胞; 乳糖酶; 连续水解

Continuous Lactose Hydrolysis in Milk with Osmotic *K. lactis* Cells

LI Su-fen¹, CHEN Zhan-zhou¹, LIU Jian-fu², CHEN Qing-sen²

(1. School of Agriculture, Hebei Engineering University, Handan 056001, China 2. Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Department of Bioengineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Osmotic *K. lactis* cells were packed into packed bed reactor to hydrolyze lactose in milk. The thermal inactivation of lactase entrapped in *K. lactis* cells followed the first-order kinetics, and its half-life was 9.5h at 40℃. Apparent K_m constant and maximum reaction rate for the enzyme were 0.39 mmol/ml and 0.188 mmol/min, respectively. The optimal reaction parameters for hydrolysis of lactose in milk with osmotic *K. lactis* cells packed in 2.6cm×50 cm column are: flow rate 1.0 ml/min at 40℃. Under these conditions, hydrolyzed glucose concentration reaches 45.2 mg/ml.

Key words packed-bed reactor; osmotic *K. lactis* cell; lactase; lactose; continuous hydrolysis

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0254-04

牛乳含有优质的动物蛋白质、脂肪、乳糖、多种矿物质及维生素, 被誉为“营养价值最接近于完善的天然食物”。乳糖是由一分子葡萄糖基和一分子半乳糖基组成的二糖, 其在牛乳中的含量为 5% 左右。牛乳中的乳糖在人体肠道内经 β -半乳糖苷酶水解生成葡萄糖和半乳糖后被小肠吸收利用, 半乳糖具有促进脑苷脂类和粘多糖生成的生理功能, 其对婴幼儿智力发育非常重要^[1]。人体肠道内若缺乏 β -半乳糖苷酶, 乳糖不能被水解吸收, 导致乳糖在肠道内发生积累。由于乳糖的水分活度低, 其容易从肠道内吸收大量的水分, 从而引起人体肠鸣、肠痉挛、腹胀、腹泻、呕吐等症状, 即乳糖不耐症。据研究报道, 目前我国 3 亿人群存在乳糖不耐症^[2], 难以代谢吸收牛乳中的乳糖。

乳糖是乳糖酶 (EC3.2.1.23) 的天然底物, 应用来源于微生物的乳糖酶催化牛乳中的乳糖水解从而降低牛乳中乳糖含量是解决人体乳糖不耐症的主要途径^[3]。游离或固定化的乳糖酶均可以催化乳糖水解, 游离乳糖酶水解牛乳中的乳糖后难以从牛乳中分离, 限制了酶的重复利用; 固定化乳糖酶存在酶的回收率低或稳定性差等问题^[4]。作者研究发现乳克鲁维酵母 (*K. lactis*) 细胞经有机溶剂处理后细胞具有一定的通透性, 乳糖及水解生成的葡萄糖和半乳糖等小分子可以自由进出渗透性 *K. lactis* 细胞, 而乳糖酶等大分子物质被限制在细胞内, 因而渗透性 *K. lactis* 细胞内乳糖酶可以催化牛乳中乳糖的水解, 该法具有操作简单、酶的活力高、细胞可以重复利用等优势。本文探讨了应用填充床反应器, 渗透性 *K. lactis*

收稿日期: 2006-08-14

基金项目: 河北工程大学青年教师资助项目

作者简介: 李素芬 (1970-), 女, 讲师, 研究方向为农产品加工。

细胞内乳糖酶连续催化牛乳中乳糖水解的反应条件。

1 材料与方法

1.1 材料

乳克鲁维酵母(*K. lactis*) 本实验室保藏,菌株编号TS305;葡萄糖测定试剂盒 保定长城临床试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 渗透性*K. lactis*细胞的制备

30L发酵罐生产的*K. lactis*发酵液经冷冻离心(3000r/min、4℃、10min)后得到湿细胞,用pH7.0,0.1mol/L的磷酸盐缓冲液将湿细胞分散成菌悬液,将该菌悬液移入酶反应器中,加入2%甲苯,在40℃下恒温水浴、磁力搅拌下处理30min后,冷冻离心收集的湿细胞即为渗透性*K. lactis*细胞,用缓冲液洗细胞2~3次,以去除细胞表面残留的有机溶剂。

1.2.2 牛乳中乳糖水解生成的葡萄糖含量测定^[5]

1.2.2.1 测定原理

葡萄糖氧化酶在有氧的条件下,催化葡萄糖氧化,产生过氧化氢。在过氧化氢酶的催化下,生成的过氧化氢与4-氨基安替比林和苯酚生成红色醌亚胺,在波长505nm处醌亚胺有最大吸收峰。图1为酶法测定葡萄糖浓度的标准曲线。

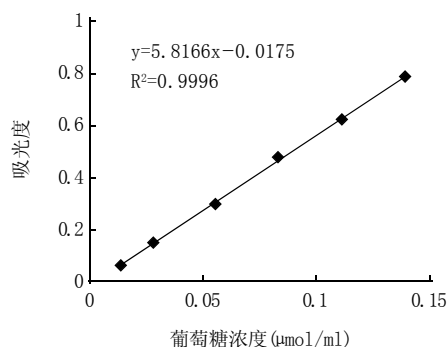


图1 葡萄糖浓度与吸光度(OD₅₀₅)关系曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

1.2.2.2 测定方法

样品液用酸法沉淀蛋白后离心得到上清液,取2ml上清液与等量的葡萄糖测定试剂混合,于40℃保温10min,于波长505nm测定OD值,根据图1中标准曲线的回归方程得出上清液中葡萄糖的含量

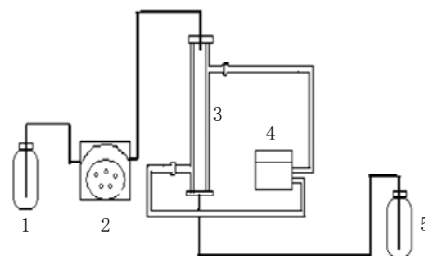
1.2.3 渗透性*K. lactis*细胞内乳糖酶活力的测定

向试管中加入浓度为50mg/ml的乳糖溶液2.8ml(用pH7.0,0.1mol/L的磷酸缓冲液溶解)经过40℃恒温水浴中预热10min后,加入浓度为0.1g/ml渗透性*K. lactis*湿细胞菌悬液0.2ml,40℃恒温下反应10min,立即取出置

于沸水浴中灭酶5min,冷却后采用酶法测定生成的葡萄糖含量。

1g*K. lactis*湿细胞1min催化乳糖水解生成1mmol葡萄糖定义为一个酶活力单位。

1.2.4 连续催化牛乳中的乳糖水解的方法



1. 进料贮瓶; 2. 恒流泵; 3. 夹套层析柱; 4. 恒温水浴锅; 5. 出料贮瓶。

图2 填充床细胞反应器连续水解牛乳乳糖的装置示意图

Fig.2 Apparatus of continuous hydrolysis of lactose in milk

将制备好的渗透性*K. lactis*湿细胞10g和生鲜牛乳150ml装入2.0cm×50cm的夹套层析柱内,旋紧上下端口,将夹套层析柱与超级水浴锅相连,夹套层析柱的内管上端通过软管与恒流泵和装有生鲜牛奶的进料贮瓶相连,内管下端通过软管与出料贮瓶相连,如图2。开启恒温水浴锅调节至所需的酶反应温度,同时开启恒流泵调节至一定体积流量后开始反应,流出液超过两个床体积后,从出口端取样,测定样品中水解生成的葡萄糖的量。

1.2.5 温度对渗透性*K. lactis*胞内乳糖酶稳定性的影响

渗透性*K. lactis*在40、45和50℃的水浴温度条件下分别保温8、16、24、32h后测定胞内乳糖酶残留的活力。

1.2.6 *K. lactis*胞内乳糖酶半衰期的测定

应用填充床细胞反应器,酶反应温度40℃,以1.5ml/min的流速进行反应,反应进行8、16、24、32h时分别从夹套层析柱内取出少量细胞测定胞内乳糖酶的活力。

1.2.7 *K. lactis*胞内乳糖酶动力学参数的测定

生鲜牛奶中的蛋白质经酸沉淀、离心后得到上清液乳清(乳清中含有乳糖),将乳清稀释1、2、4、6、8倍后分别取2.8ml加入试管中40℃恒温水浴预热后,加入0.2ml适当稀释的渗透性*K. lactis*细胞悬液,反应5min后立即置于沸水浴灭酶5min,取200μl反应液测定葡萄糖的生成量,每分钟酶水解生成的葡萄糖毫摩尔数定义为反应速率V,以1/V的倒数为纵坐标、底物S的倒数1/S为横坐标作图。

1.2.8 温度对乳糖水解率的影响

应用填充床细胞反应器,分别在35、40、45和

50℃的水浴温度条件下进行酶反应,流出液超过两个床体积后,从出口端取样,测定样品中水解生成的葡萄糖的量。

1.2.9 体积流速对乳糖水解率的影响

应用填充床细胞反应器,酶反应温度40℃,分别以0.5、1.0、1.5、2.0和2.5ml/min的体积流速进行水解反应,流出液超过两个床体积后,从出口端取样,测定样品中水解生成的葡萄糖的量。

2 结果与分析

2.1 温度对*K. lactis*胞内乳糖酶的稳定性的影响

图3表明了温度对渗透性*K. lactis*胞内乳糖酶稳定性的影响。由图3可知,在相同的保温温度条件下,随着保温时间的延长酶残存活力的对数值呈线性降低,表明该酶的热失活遵循一级反应动力学。保温的温度与酶的残存活力的对数值呈负相关。

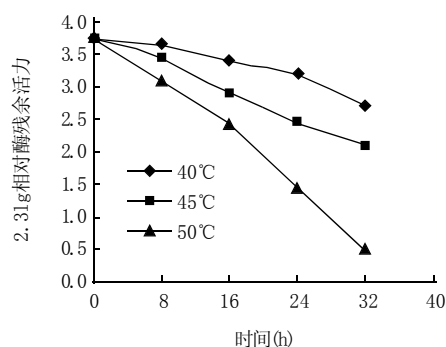


图3 温度对*K. lactis*胞内乳糖酶的稳定性的影响

Fig.3 Effects of temperature on stability of *K. lactis* lactase

2.2 *K. lactis*胞内乳糖酶的半衰期

酶反应温度40℃时,渗透性*K. lactis*胞内乳糖酶残存活力的对数值与保温时间呈线性关系(图4),该直线的回归方程为: $y = -0.0319x + 3.85$,直线的斜率 $= -\frac{k}{2.303}$ (k 为酶失活的速率常数),即: $-\frac{k}{2.303} = 0.0319$,因此

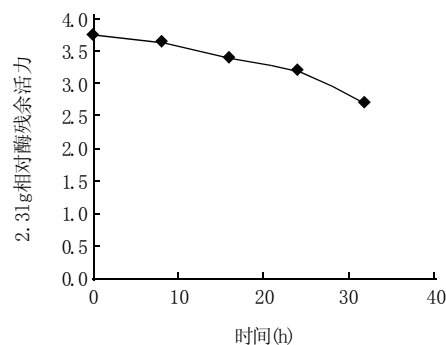


图4 酶反应过程中*K. lactis*胞内乳糖酶的热失活

Fig.4 Thermal inactivity of *K. lactis* lactase during enzyme reaction

$$\text{酶的半衰期 } t_{1/2} = \frac{0.693}{k} = 9.5 \text{ h.}$$

2.3 动力学参数的测定

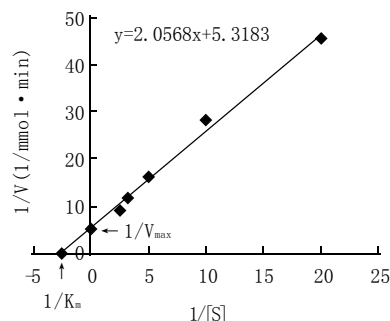


图5 底物浓度对渗透性*K. lactis*催化乳糖水解反应速率的影响

Fig.5 Effects of substrate concentration on hydrolysis rate of lactose by *K. lactis* lactase

图5表明了底物(乳糖)浓度对渗透性*K. lactis*细胞内乳糖酶催化乳糖水解反应速率的影响,由图5可知,底物浓度的倒数与反应速率的倒数呈直线关系,该直线的回归方程为: $y = 2.056x + 5.3183$,由该回归推倒得出:渗透性*K. lactis*细胞内乳糖酶水解牛乳中乳糖的表观米氏常数 K_m 为0.39mmol/ml,最大反应速率 V_{max} 为0.188mmol/min。

2.4 反应温度对牛乳中乳糖水解的影响

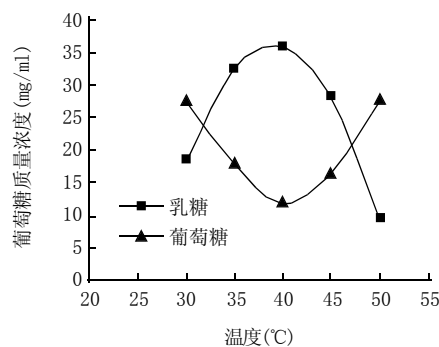


图6 酶反应温度对牛乳中乳糖水解的影响

Fig.6 Effects of temperature on yield of lactose hydrolysis

图6为以生鲜牛乳中的乳糖为底物时,反应温度对填充床反应器中牛乳中乳糖水解的影响。由图6可以看出,渗透性*K. lactis*细胞内乳糖酶在填充床反应器内催化乳糖水解反应的最适温度40℃。在30~40℃温度范围内,随着反应温度的增加,反应达到平衡后生成的葡萄糖的质量浓度升高,而未水解的乳糖浓度降低;在40~50℃温度范围内,反之。这是由于:温度既能改变酶反应本身的速率,也能导致酶蛋白变性失活,后者的温度系数大于前者,即温度低于40℃时,温度升高引起酶催化增加速率大于酶失活增加的速率,酶的催化效率随温度增加而增加;温度高于40℃时,随着温

度升高, 酶发生热失活, 催化乳糖水解的能力降低。

2.5 体积流速对乳糖水解的影响

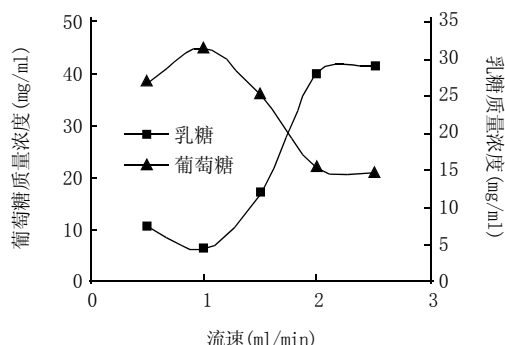


图7 体积流速对牛乳中乳糖水解的影响

Fig.7 Effects of volume flow rate on yield of lactose hydrolysis

填充床反应器的体积流速影响牛乳中乳糖的水解(图7), 体积流速为1.0ml/min时生成的葡萄糖的质量浓度最高, 此时牛乳中乳糖水解生成的葡萄糖的质量浓度为45.2mg/ml。

3 结论

渗透性 *K. lactis* 细胞内乳糖酶的热失活遵循一级反

应动力学, 40℃时酶的半衰期为9.5h, 表观米氏常数为0.39mmol/ml, 最大反应速率 V_{\max} 为0.188mmol/min。在2.6cm × 50cm 填充床生物反应器上, 渗透性 *K. lactis* 细胞内乳糖酶催化牛乳中乳糖水解的适宜体积流速为1.0ml/min, 酶反应的适宜温度40℃, 反应速率达到动态平衡后生成的葡萄糖的质量浓度为45.2mg/ml, 牛乳中乳糖的水解率为91.3%。

参考文献:

- [1] RICHMOND M L, GRAY J L, STINE C M. β -galactosidase: a review of recent research related to technological application, nutritional concerns and immobilization[J]. J Dairy Science, 1981, 64: 1759-71.
- [2] INCHAURRONDO V A, YANTORNO O M. Yeast growth and beta-galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium[J]. Process Biochemistry, 1994, 29: 47-54.
- [3] ERZSEBET F, LEVENTE K, ERZSEBET S. Regulation of formation of intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*[J]. Arch Microbiol, 2002, 179: 7-14.
- [4] FODA M L, LOPEZ LEIVA M H. Continuous production of oligosaccharide from whey using a membrane reactor[J]. Process Biochemistry, 2000, 35: 581-587.
- [5] PETZELBAUER I, NIDETZKY B. Development an ultra-high-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 64: 322-332.

信息

甲、丙肝病毒可攻击同一蛋白躲避免疫攻击

尽管都是感染肝脏, 甲肝和丙肝病毒却极少有共同点。这两种病毒在遗传上间隔很远, 传播途径不同并且导致很不同的疾病。甲肝通过摄入被感染患者的排泄颗粒(存在于受污染的食物、水等等)来传染, 而丙肝则是主要通过直接接触被感染血液来传播。

此外, 甲肝引发发烧、恶心和腹痛, 但很少能导致死亡; 丙肝则常常会经历数十年来破坏肝脏, 到最后只有通过器官移植来拯救患者。

德克萨斯州大学 Galveston 医学分校的研究人员则认为这两种无关的肝脏病毒具有一个重要的相同点, 就是避开免疫系统破坏的伎俩相同。两种病毒都通过攻击同一个蛋白来避避免疫攻击, 而这个蛋白是引发抗病毒应答一个分子信号链中的关键连接点。

研究人员解释说, 细胞中有大约30000种蛋白质, 但是这两种几乎完全不同的病毒却选择攻击同一个蛋白质。研究人员将这项研究的结果刊登在《美国国家科学院院刊》(PNAS)的在线版上。他们确定这种蛋白质叫做MAVS, 是一种线粒体抗病毒信号蛋白, 对肝脏中任何病毒的存活至关重要。

MAVS 蛋白质将少部分伸出线粒体外, 当特化的受体分子检测到细胞中的病毒时, 它们会停泊在MAVS蛋白上, 引发一系列信号, 最终导致 β 干扰素的产生。今年有研究显示, 丙肝能够产生一种叫做NS3/4A的蛋白质, 这种蛋白能够切割MAVS, 进而干扰免疫信号并可能为病毒提供在肝脏中存活更长时间所需的保护。