

乳清中乳糖的酶法水解

李强军

全文海

(食品科学与工程系)

(发酵工程系)

摘要 本文研究了 *Aspergillus niger* CWL2NU-3 乳糖酶在乳清中的应用,探讨了温度、pH、金属离子、底物浓度、酶浓度及水解时间等因素对乳清中乳糖的酶法水解速度的影响,在此基础上确定了主要影响因素,通过正交试验,获得乳清中乳糖水解的最佳工艺条件(65℃、pH4.5、乳糖15%、 $[E]/[L]=0.03$ 、水解时间2.5h),在此条件下乳糖水解率为91.0%。

关键词 乳糖酶; 乳清; 乳糖的水解; 黑曲霉

0 前言

乳清是乳品工业的主要副产品。据统计,全世界每年乳清的产量高达数十万吨^[1],但目前乳清尚未得到很好的利用,许多乳品厂将乳清直接排放到自然界^[2]。由于乳清的BOD(Biological oxygen demand)值很高,达30000—40000ppm^[3],因此造成了严重的环境污染,引起了人们的极大关注。在美国,许多市政当局对乳品厂实行了严格的废物排放控制,并开始征收乳清处理附加费^[2]。

在每升乳清中含有6—9g蛋白质,45—50g乳糖,6—9g无机盐,1—2g脂肪。其中蛋白质可以用超滤技术回收^[4-7]作为食品原料。

乳清分离蛋白质所得的渗透液(Permeate)中主要含有乳糖。由于乳糖溶解度小和甜度低,许多人不耐受等缺点,因而渗透液几乎没有利用价值。如果将渗透液中乳糖水解成葡萄糖和半乳糖,因所获得的混合糖浆具有较高的甜度,则可用作食品工业甜味剂。

乳糖的水解方法有:强酸性离子交换树脂水解法^[8],酸水解法^[9],酶水解法^[10]等。由于强酸性离子交换树脂水解法和酸水解法反应条件剧烈,常伴有副反应发生,影响产品的质量。而酶水解法条件温和,反应专一,无副反应产生,产品质量较好,是目前研究最多的一种方法。

文献^[11-13]报道的乳清中乳糖的水解都是在60℃以下进行的,其中许多是在常温和低温下进行的,因而水解速度缓慢,水解时间长。在常温下水解时,还易受杂菌污染。作者通过选育获得一株产高温乳糖酶的菌株 *Aspergillus niger* CWL2NU-3^[14]。本文报道乳清中该菌乳糖酶的性质及乳清中乳糖水解最佳工艺条件的试验。

1 材料与方法

本文1991年2月21日收到

本文是在汤遂教授和向瑞春教授指导下完成的

1.1 酶的制备

按文献^[14]报道的发酵条件,接种 *A. niger* CWL2NU-3 菌株进行摇瓶发酵,发酵液经离心分离 (8000r/min、30min、4℃),收集上清液,于室温下,用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行分级盐析,收集50%—80%饱和度的沉淀,溶于pH4.6、0.05mol/l柠檬酸钠缓冲液中,经 Sephadex G-25($\phi 2.5 \times 40\text{cm}$)脱盐,收集活性部分,超滤浓缩,贮于冰箱备用(酶的比活为 4.05 ONPG 单位/mg蛋白质)。

1.2 乳清液的制备

称取一定量的乳清粉,加蒸馏水配制成含30%乳糖的乳清液,以此作为母液,试验中所需的不同乳糖浓度的乳清液均由母液经适当稀释后而得。

1.3 乳清中乳糖的测定

准确称取5g乳清粉,溶于适量的蒸馏水中,加入 5ml、21.9%(w/v) $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 及 5ml、10.6%(w/v) $\text{KFe}(\text{CN})_3$ 溶液,定容至500ml,静置沉淀10min左右,过滤,采用硫酸—酚法^[15]测定滤液中乳糖的浓度,由此计算乳清粉中乳糖的含量为71%。

1.4 乳糖水解速度的测定

在本试验条件下,乳糖水解一定时间后,取样,沸水浴加热3min,用葡萄糖氧化酶——过氧化物酶法^[11]测定水解产生的葡萄糖。1min内1ml反应液中水解产生的葡萄糖 μmol 数为乳糖的水解速度($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$)。

1.5 蛋白质的测定

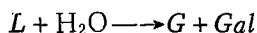
采用改良的Lowry法测定乳清中蛋白质^[16]。

1.6 葡萄糖的测定

采用葡萄糖氧化酶——过氧化物酶法^[17]测定乳清及水解液中葡萄糖的含量。

1.7 乳清水解液中乳糖及半乳糖浓度的计算

按上述方法测定乳清中乳糖及葡萄糖,采用减量法计算水解液中乳糖及半乳糖的浓度。



$$[L_0] = [L] + [G] - [G_0]$$

$$\frac{C_{L0}}{M_L} = \frac{C_L}{M_L} + \frac{C_G - C_{G0}}{M_G}$$

$$\text{乳糖: } C_L = \left(\frac{C_{L0}}{M_L} - \frac{C_G - C_{G0}}{M_G} \right) M_L$$

反应开始时,体系中半乳糖含量可忽略不计,则半乳糖:

$$C_{G_{a1}} = C_G - C_{G0}$$

式中

L 、 $[L_0]$ 、 $[L]$ ——分别表示乳糖、反应开始时和反应进行到某一时刻乳糖的摩尔浓度;

G 、 $[G_0]$ 、 $[G]$ ——分别表示葡萄糖、反应开始时和反应进行到某一时刻葡萄糖的摩尔浓度;

G_{a1} ——半乳糖浓度;

C_{L0} 、 C_L ——反应开始和反应进行到某一时刻乳糖的浓度(w/v);

C_{G0} 、 C_G ——反应开始和反应进行到某一时刻葡萄糖的浓度(w/v);

C_{Gal} ——反应进行到某一时刻半乳糖的浓度(w/v);

M_L ——乳糖分子量;

M_G ——葡萄糖分子量

1.8 乳糖水解度的计算

按上述方法测定乳清中乳糖浓度及葡萄糖浓度,然后用下式计算乳糖的水解度DH(%):

$$DH(\%) = \frac{\text{水解产生的葡萄糖浓度 (mmol/l)}}{\text{水解开始时乳糖浓度 (mmol/l)}} \times 100$$

1.9 脂肪的测定

采用罗斯——高特里巴(Rose—Gottlieb)法测定乳清中脂肪的含量^[18]。

1.10 灰分的测定

乳清液和乳清水解液经截留分子量为10000的超滤膜超滤,滤液中的灰分采用电导法^[19]测定。

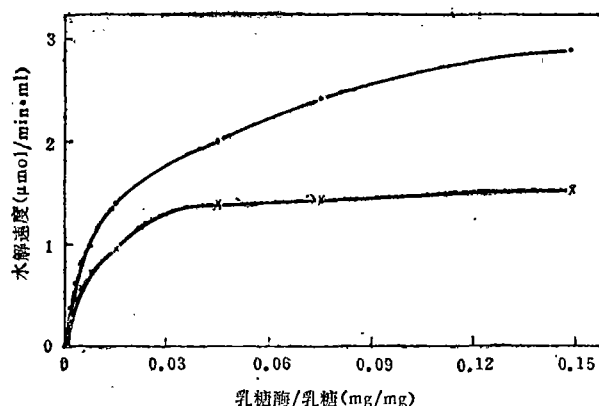
1.11 试剂与仪器

乳清粉: 从西兰进口(上海乳品二厂提供); 葡萄糖测定试剂盒: 卫生部上海生物制品研究所产品; 其他试剂,采用分析纯或优级纯; DDS—11C型电导率仪: 上海雷磁仪器厂出品。

2 结 果

2.1 酶浓度的影响

为了确定乳清中乳糖水解试验中的加酶量,试验了酶浓度对水解速度的影响。图1表明,在酶浓度较低时,水解速度随酶浓度增加而迅速增加,当酶浓度超过0.03 mg/mg乳糖时,反应速度即缓慢增加,由此可见加酶量以0.03mg酶蛋白/mg乳糖为佳。图1还表明,反应速度随着反应时间增加而下降,这可能是产物对酶抑制而引起的。

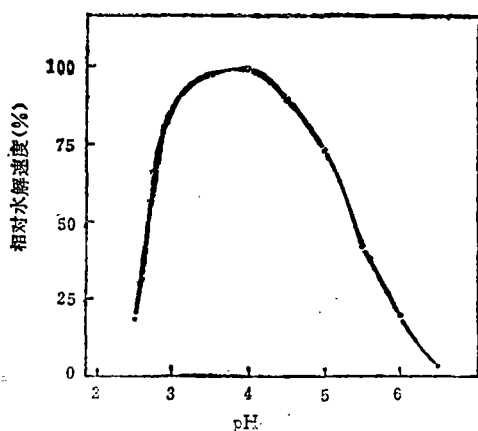


•—• 60°C pH1.0 15%乳糖 反应30min
×—× 60°C pH4.0 15%乳糖 反应60min

图1 酶浓度对乳清中乳糖水解速度的影响

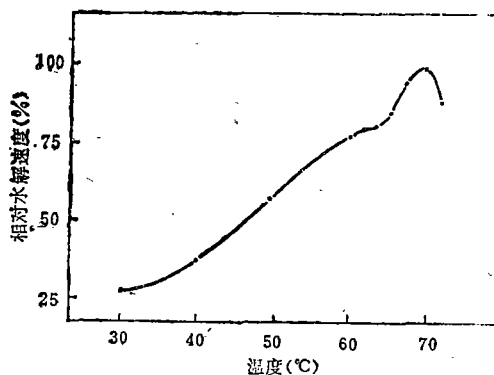
2.2 pH对乳清中乳糖水解速度的影响

图2表明,乳清中乳糖的酶法水解以pH4.0为宜。当pH在3.0—4.0时,pH的改变对水解速度影响不大。由此可见,乳清中pH对酶反应的影响与乳糖溶液中的影响^[14]相似。



温度60℃ 乳糖10% 加酶量0.3mg/ml 15min

图2 pH对乳清中乳糖水解速度的影响



pH4.0 乳糖10% 加酶量0.3mg/ml 15min

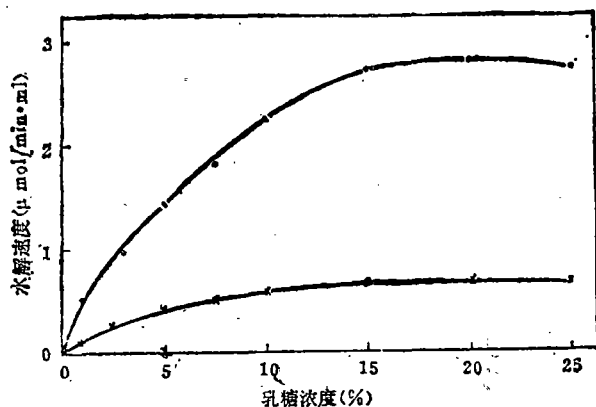
图3 温度对乳清中乳糖水解速度的影响

2.3 温度对乳清中乳糖水解速度的影响

如图3所示,最适温度为70℃。当超过70℃后,反应速度迅速下降,这表明酶开始失活。在以乳糖为底物的试验中^[14],温度与酶的相对活力曲线上出现了两个峰值,一个为55℃,另一个为70℃。但在图3中,55℃处未见峰值而在64℃左右处出现一个肩峰,这可能是乳清中存在的蛋白质或其他物质对55℃峰值的酶分子具有影响而导致其最适温度向高温移动之故。

2.4 底物浓度对乳清中乳糖水解速度的影响

由图4可见,乳清中乳糖的水解速度随乳糖的浓度增加而增加(0—15%);当乳糖浓度达15%后,水解速度则缓慢增加。乳糖浓度为20%时,水解速度达最大(2.9μmol/min·ml)。Wierzbicki 和 Kosikowski^[27]在乳清中乳糖水解动力学研究中测得乳清中乳糖浓度为22%时水解速度最大。



×—× 60℃ pH4.0 [E]=0.5mg/ml 15min

·—· 60℃ pH4.0 [E]=2.5mg/ml 15min

图4 底物浓度对乳清中乳糖水解速度的影响

2.5 金属离子对乳清中乳糖水解速度的影响

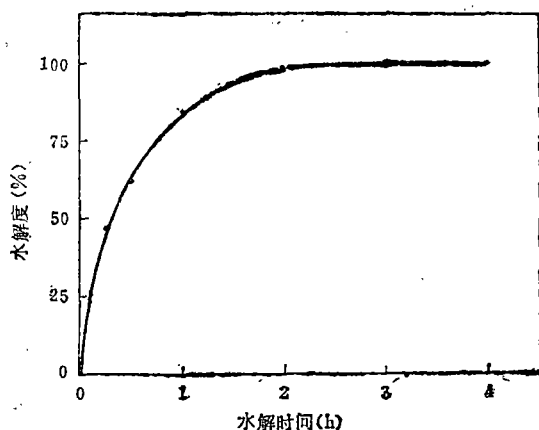
为了寻找对酶有激活作用的金属离子和试剂等, 试验了 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 等18种金属离子和EDTA、巯基乙醇对乳清中乳糖水解速度的影响。表1表明, Pb^{2+} 和 Ag^+ 对酶有轻微的抑制作用, 其它离子在所试验的条件下, 对酶反应速度无显著的影响。

表1 金属离子对乳清中乳糖水解的影响

添加物	浓 度 (mmol/l)	相对速度 (%)	添加物	浓 度 (mmol/l)	相对速度 (%)
KCl	1	100.2	$PbAc_2$	1	87.8
NaCl	1	98.6	$CuSO_4$	1	103.3
$CaCl_2$	1	106.2	$HgSO_4$	1	103.7
	5	101.7	$AgNO_3$	1	39.6
$MgSO_4$	1	102.3	$COCl_3$	1	96.5
$MnSO_4$	1	93.9	$TiCl_3$	1	100.5
	5	103.5	$NiSO_4$	1	106.1
$ZnSO_4$	1	95.2	$BaCl_2$	1	98.6
$AlCl_3$	1	95.5	EDTA	1	94.7
$FeSO_4$	1	101.1	巯基乙醇	1	103.4
$FeCl_3$	1	92.1			
$SnCl_2$	1	99.7	对照	1	100

2.6 反应过程曲线

图5为反应时间与乳糖水解度之间的关系。在本试验条件下, 反应1h, 水解度已超过80%; 水解2h后, 乳糖已基本水解完全。



15%乳糖 60℃ pH4.0 $[E]/[L] = 0.03$

图5 反应过程曲线

2.7 乳清中乳糖水解条件的试验

通过前面的试验得到影响乳清中乳糖水解的主要因素为 T 、 pH 、 $[L]$ 、 $[E]/[L]$ 及 t , 选用 $L^{16}(4^5)$ 正交表进行最佳工艺条件试验, 结果见表2。分别对表2中反应速度与各因素之间的关系用方差分析法加以处理, 得表3和表4。由表3可见, 加酶量、水解时间及底物浓度对水解速度的影响显著, 温度的影响较显著, 在本试验范围内 pH 的影响不显著。由表4可看出, 加酶量对水解度影响显著, 温度的影响较显著, 而水解时间、底物浓度、 pH 对水解度影响不显著。

表2 正交试验表

	E	t	T	pH	L	V ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$)	DH (%)
1	2.5	1.5	70	3.5	20	15.1	61.4
2	2.5	2.0	65	4.0	17.5	10.6	65.7
3	2.5	2.5	60	4.5	15	7.5	67.9
4	2.5	3.0	55	5.0	12.5	5.1	66.2
5	5.0	1.5	65	4.5	12.5	14.0	90.5
6	5.0	2.0	70	5.0	15	12.3	88.8
7	5.0	2.5	55	3.5	17.5	10.4	80.6
8	5.0	3.0	60	4.0	20	10.7	86.4
9	7.5	1.5	60	5.0	17.5	15.0	69.5
10	7.5	2.0	55	4.5	20	12.1	63.29
11	7.5	2.5	70	4.0	12.5	10.1	100
12	7.5	3.0	65	3.5	15	9.8	100
13	8.7	1.5	55	4.0	15	15.7	84.6
14	8.7	2.0	60	3.5	12.5	11.2	96.5
15	8.7	2.5	65	5.0	20	14.0	94.2
16	8.7	3.0	70	4.5	17.5	10.2	94.2

注: E ——酶浓度(mg/ml) t ——反应时间(h)

T ——温度($^{\circ}\text{C}$) pH ——反应物 pH 值

L ——乳糖浓度(%) V ——反应速度($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$)

DH ——水解度(%)

表3 水解速度方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
酶浓度	21.2	3	7.1	12.0	※※
时 间	77.7	3	25.9	43.9	※※
温 度	45	3	1.5	2.5	(※)
底 物	16.8	3	5.6	9.5	※※
pH	1.6				
误 差	0.14	3	0.6		
总 和	121.9	15			

$$F_{0.01(5,3)} = 5.42; \quad F_{0.25(3,3)} = 1.25$$

表4 水解度方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
加酶量	1460.9	3	487.0	5.3	※
时 间	298.2	3	99.4	1.07	
温 度	453.7	3	151.2	1.63	(※)
底 物	398.7	3	132.9	1.44	
pH	93.3	3	92.6		
误 差	184.6	3			
总 和	2880	15			

综合考虑上述各因素对水解速度及水解度的影响,以及成本和工作效率等因素后,确定乳清中乳糖水解最佳工艺条件为:温度65℃,pH4.5,乳糖15%, $[E]/[L] = 0.03$,时间2.5h。

2.8 乳清水解液成分分析

在上述最佳工艺条件下进行乳清中乳糖的水解试验,恒温水浴中振荡(100r/min)水解2.5h,沸水浴中热处理5min,终止反应,测定水解前后各成分变化,结果见表5,水解度达91.0%。水解液经离心除去沉淀后得到金黄色、稍带奶香味的口感温甜的糖浆。

表5 乳清及乳清水解液成分

	乳 清 (%)	水 解 液 (%)
葡萄糖	0.2	33.2
半乳糖		32.9
乳 糖	71	6.5
蛋白质	15.8	20.5
灰 分	12.9	5.9
脂 肪	0.73	0.72
水解度(%)	0	91.0

3 讨 论

乳清中存在的蛋白质和其他物质可能影响乳糖酶的性质。CWL2NU-3菌株乳糖酶在水解乳清中乳糖时,温度与其水解速度的关系(图2)同水解乳糖溶液(由缓冲液配制)时的关系^[14]相比,有明显不同,这可能是其中一种分子形成的酶(研究表明A. niger CWL2NU-3乳糖酶有3种分子形式^[14])与乳清中某种成分作用后,致使这一分子形式的酶温度特性改变。乳糖酶的性质受牛乳中成分影响有不少报道,例如:Mahoney和Adamchuk^[20]报道了牛奶蛋白质和纯化的 α -乳清蛋白与 β -乳球蛋白对脆壁酵母(K. fragilis)乳糖酶水解乳清中乳糖有激活作用;Jakubowski J. et al^[21]报道了乳清蛋白对连接于胶原蛋白的固定化霉菌乳糖酶有抑制作用;Bernal和Jelen^[22]在试验乳酸酵母(K. lactis)乳糖酶水解脱脂奶、乳清、乳

清渗透液等体系中乳糖时,发现天然存在的牛奶蛋白质或外加蛋白质对乳糖水解都没有影响, Mahoney和Wilder^[23]在研究牛奶中乳糖的酶法水解时发现,牛奶存在的 Na^+ 、 K^+ 、乳糖、半乳糖、酪蛋白酸盐等对马克斯克鲁氏酵母(*K.marxianus*)乳糖酶都有稳定作用。由此看来,牛奶中的各种成分对不同来源的乳糖酶的性质影响不同。

乳糖酶主要用于食品加工、乳清处理等方面,这些原料中含有丰富的营养成分,是微生物的天然培养基。为了避免染菌,加速乳糖水解,人们希望使用作用温度较高的乳糖酶。CWL2NU-3菌株乳糖酶在乳清中最适温度为70℃(图2)比国外已开发的乳糖酶作用温度都高(脆壁酵母乳糖酶最适温度为37℃^[24],乳酸酵母乳糖酶最适温度为35℃^[24],米曲霉乳糖酶最适温度为50—55℃^[25],黑曲霉乳糖酶最适温度为55—60℃^[24],大肠杆菌乳糖酶最适温度为40℃^[24],马克斯克鲁氏酵母乳糖酶最适温度为45—52℃^[26]),该酶可以在巴氏灭菌温度(65℃)下使用,由此避免了杂菌的生长。

本文通过正交试验获得了最佳工艺条件。在此条件下,含15%乳糖的乳清水解度达91%,而Wierzbicki和Kosikowski使用的黑曲菌乳糖酶,在含14%乳糖的乳清中水解5h后,其水解度只有65%左右^[27]。可见,2NU-3菌株乳糖酶很适合乳清中乳糖的水解。

参 考 文 献

- 1 ジャン・ルク・ヲテン・ギ・バレ公开特许公报,昭57—22696
- 2 Knopf F C, Okos M R, Fouts D A and Syvrson, J Food Sci, 1979; 44: 896
- 3 Declive M, Huyhn N Van and Motte J C. Appl Microbiol Biotechnol, 1985; 21: 103
- 4 Miller J J and Brand J C. Food Technol(Australia), 1980; 32: 144
- 5 Giec A and Kosikowski. J Dairy Sci, 1983; 66: 396
- 6 Shah N and Jelen P. Milchwissenschaft, 1987; 42(12): 782
- 7 Sheth H, Jelen P and Shah N. J Food Sci, 1988; 53(3): 746
- 8 Block R J. U S Patent 2592509
- 9 Conghlim J R and Nickerson T A. J Dairy Sci, 1975; 58(2): 169
- 10 Shukla T P. CRL Critical Reviews in Food Technology, 1975; 5: 3
- 11 Wierzbicki L E and Kosikowski F V. J Dairy Sci, 1972; 56(9): 1182
- 12 Giec A and Kosikowski F V. J Dairy Sci, 1983; 66(3): 396
- 13 Sheth H, Jelen P and Shah H. J Food Sci, 1988; 53(3): 746
- 14 李强军.微生物乳糖酶的研究.博士学位论文, 1989; 10
- 15 Dukis M, et al. Anal Chem, 1956; 28: 350
- 16 Bensadoun A, et al. Anal Biochem, 1976; 70: 241
- 17 卫生部上海生物制品研究所.葡萄糖测定试剂盒使用说明书。
- 18 刘福岭,戴行钧.食品物理与化学分析方法.北京:轻工业出版社, 1987; 40
- 19 华南工学院等.制糖工业分析.北京:轻工业出版社, 1981; 183

- 20 Makoney R R and Adamchuk C. J Food Sci, 1980; 45: 962
- 21 Jakubowski J, et al. J Food Sci, 1975; 40: 467
- 22 Bernal V and Jelen P. Can Inst Food Sci Technol J, 1985; 10: 97
- 23 Mahoney R R and Wilander T. J Dairy Research, 1988; 55: 123
- 24 Greenberg N A and Mahoney R R. Process Bioch, 1981; 16(2): 2
- 25 Park Y, Santi M and Pastore G M. J Food Sci, 1979; 41: 100
- 26 Goncalves J A and Castillo F J. J Dairy Sci, 1982; 65: 2088
- 27 Wierzbicki L E and Kosikowski F V. J Dairy Sci, 1972; 56(11): 1396

The Enzymatic Hydrolysis of Lactose in Whey

Li Qiangjun

Quan Wenhai

(Dept. of Food Sci. and Eng.) (Dept. of Ferment. Eng.)

Abstract In this paper, the application of lactose from strain *Aspergillus niger* CWL2 NU-3 in whey is studied. The effects of temperature, pH value, metal ions, substrate concentration and hydrolysis time on the rate of enzymatic hydrolysis of lactose are investigated, and then the principal factors are determined. By orthogonal experimental method, the optimum condition (65°C, pH4.5, lactose 15%, hydrolysis time 2.5hr, (E)/(L)=0.03) for the enzymatic hydrolysis of lactose in whey is obtained. Under the condition, the degree of lactose hydrolysis in whey is 91.0%.

Keywords lactose; whey; hydrolysis of lactose; *Aspergillus niger*