

土生拉乌尔菌 Y₂₀ 产乳糖氧化酶发酵条件优化

宁 崇, 郑 艳*, 赵素洁, 孙宇强

(沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110086)

摘要: 以选育的土生拉乌尔菌(Y₂₀)为生产菌株,在单因素和响应面分析的基础上考察了不同发酵条件对乳糖氧化酶活性的影响。方差分析结果表明,发酵条件对乳糖氧化酶活性影响次序:初始 pH>发酵时间>接种体积分数>发酵温度。响应面分析优化的最适发酵条件:发酵时间 25 h,发酵温度 28 ℃,初始 pH 7.2,接种体积分数 2%。最优发酵条件下乳糖氧化酶的实际酶活可达 78.36 U/g,与预测的酶活 78.85 U/g 接近。

关键词: 土生拉乌尔菌 Y₂₀;乳糖氧化酶;响应面分析;优化

中图分类号: TQ920.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)08—0879—07

Optimum Fermentation Condition of Production Lactose Oxidase by *Raoultella terrigena* Y₂₀

NING Chong, ZHENG Yan*, ZHAO Sujie, SUN Yuqiang

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The effects of fermentation conditions on lactose oxidase activity producing by *Raoultella terrigena* Y₂₀, which was screened by our lab, were studied by single factor experiment and response surface methodology. The results showed that the four independent variables as initial pH value, fermentation time, inoculation amount and fermentation temperature had significant and sequence effects on the lactose oxidase activity. The optimal fermentation conditions were as follows, inoculum amount of 2%, initial pH at 7.2, fermented 25 h, temperature at 28 ℃. Under the optimal conditions, the lactose oxidase activity was 74.96 U/g, which was almost consistent with predicted value of 78.87 U/g.

Keywords: *Raoultella terrigena* Y₂₀, lactose oxidase, response surface methodology, optimum

乳糖酸是一种新型的多羟基有机酸^[1],因其具有多种生理功能而被广泛应用于食品、医药和精细化工行业^[2-3]。目前,欧美等国家乳糖酸的生产主要采用化学合成法^[4]。但该方法在氧化过程中伴有多种副产物的生成,致使产品分离纯化比较困难,生产成本相对较高,因此乳糖酸一直未能成为大众的化工商品,限制了其应用范围。酶法生产乳糖酸始于 1998 年,主要采用两步法。所用酶主要有纤维二

种副产物的生成,致使产品分离纯化比较困难,生产成本相对较高,因此乳糖酸一直未能成为大众的化工商品,限制了其应用范围。酶法生产乳糖酸始于 1998 年,主要采用两步法。所用酶主要有纤维二

收稿日期: 2014-04-23

基金项目: 辽宁自然科学基金项目(201202190)。

* 通信作者: 郑 艳(1973—),女,辽宁丹东人,农学博士,副教授,主要从事食品生物技术、发酵工程和酶工程方面的研究。

E-mail: zhengyan0403@163.com

糖酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖果糖氧化还原酶等,该法由于所用酶的底物专一性、稳定性等原因始终难以和化学合成法抗衡。

2001年 Xu 等发现的一种新的碳水化合物氧化酶——乳糖氧化酶^[5],该酶对乳糖氧化为乳糖酸具有较高的特异性^[6]。乳糖氧化酶可以将单糖、二糖、多糖氧化,并将电子直接传递给氧气,生成过氧化氢,再通过催化反应将过氧化氢还原为水^[7],在食品中是安全的。这种酶含有 FAD,与已经报道的葡萄糖氧化酶、己糖氧化酶或吡喃糖氧化酶不同,对寡聚糖和长碳链的聚合糖类有很高的活性,乳糖氧化酶对乳糖的亲合性也很高^[8]。

以选育的土生拉乌尔菌(Y₂₀)为出发菌株,通过单因素及响应面分析设计试验对乳糖氧化酶的发酵条件进行初步研究^[9-11],以期为该酶的发酵生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 土生拉乌尔菌 *Raoultella terrigena* (Y₂₀): 沈阳农业大学食品学院生物技术实验室选育。

1.1.2 培养基配方 固体培养基:乳糖 10 g、蛋白胨 10 g、NH₄NO₃ 2 g、NaCl 2 g、KH₂PO₄ 1 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄ 0.5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL;pH 7.2~7.4。

液体培养基:同固体培养基,不加琼脂。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 将土生拉乌尔菌(Y₂₀)在固体培养基上活化后,接种于液体培养基中,于 28℃下培养 24 h^[12]。

1.2.2 发酵条件对菌株(Y₂₀)产乳糖氧化酶能力的影响

1) 发酵时间对菌株(Y₂₀)产乳糖氧化酶能力的影响:将菌株以 1%接种体积分数接种在乳糖氧化酶发酵培养基中,其他条件相同的情况下培养 12、24、36、48、60 h,测定其酶活性。

2) 发酵温度对菌株(Y₂₀)产乳糖氧化酶能力的影响:将菌株以 1%的接种体积分数接种在乳糖氧化酶发酵培养基中,在其他条件相同的情况下于 24、26、28、30、32℃培养 24 h,测定其酶活性。

3) 起始 pH 值对菌株(Y₂₀)产乳糖氧化酶能力的

影响:将菌株以 1%的接种体积分数接种在产乳糖氧化酶发酵培养基中,其他条件相同的情况下分别调节 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,培养 24 h,测定酶活性。

4) 接种体积分数对菌株(Y₂₀)产乳糖氧化酶能力的影响:将菌株以 1%、2%、3%、4%、5%的不同接种体积分数接种于产乳糖氧化酶发酵培养基,在其他条件相同的情况下,测定其酶活性。

1.2.3 分析方法

1) 乳糖氧化酶活性的测定:乳糖氧化酶可以氧化乳糖为乳糖酸,乳糖酸在酸性条件下可分解为葡萄糖酸和半乳糖,葡萄糖酸在酸性条件下发生内酯化,形成的内酯与羟胺碱反应,生成异羟肟酸。异羟肟酸与 FeCl₃ 能生成有色络合物,从而可通过分光光度法定量分析葡萄糖酸的含量^[13]。乳糖氧化酶活性由 D-葡萄糖酸的量来检验,一个酶活单位定义为:每分钟细胞产生 1 μmol 葡萄糖酸的量。

含 0.4 mol/L 的乳糖、0.2 mol/L 磷酸氢二钠、0.1 mol/L、pH 6.0 的柠檬酸缓冲液 0.5 mL 及细胞悬液 0.5 mL 的混合液 1.0 mL,在 40℃下反应 10 min 后,加入 50 μL、1 mol/L NaOH 以终止反应。向混合物中加入 50 μL、1 mol/L HCl,中和 NaOH。反应混合物加 0.5 mL、2 mol/L HCl,煮沸 40 min,以水解乳糖酸为 D-葡萄糖酸和 D-半乳糖。在 10 mL 具塞试管中加入 0.5 mL 待测样,再加入 0.5 mL 去离子水,混合均匀后,沸水浴中加热 20 min,冷却至室温。然后顺序加入 2 mL 盐酸羟胺和 NaOH 混合试剂、1 mL、4 mol/L HCl 和 1 mL FeCl₃ 试剂,混合均匀,这时反应混合物的 pH 为 1.2±0.2。放置 10 min 后比色(波长 505 nm),以空白管(用 0.5 mL 去离子水替代样品溶液,其余试剂用量与前相同)校零,读取各管的吸光度 OD₅₀₅ 值,测定工作在 10 min 内完成^[14]。

2) 蛋白质质量浓度测定:采用紫外分光光度法,以牛血清蛋白标准品做蛋白质标准曲线,见图 1。将牛血清蛋白配置成质量浓度为 0、0.25、0.5、0.75、1.00、1.25 mg/mL 的溶液,在 280 nm 处测定吸光度值。以牛血清蛋白的质量浓度 *c* 为横坐标,280 nm 处的吸光度值做标准曲线。 $A=0.9099c+0.0052$ 。相关系数: $R=0.9992$ 。其中,*A* 为牛血清蛋白在 280 nm 处的吸光度值;*c* 为牛血清蛋白的质量浓度。

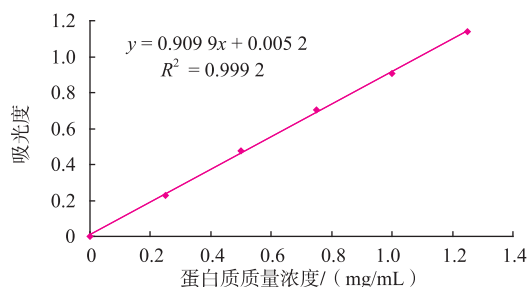


图 1 牛血清蛋白标准曲线

Fig. 1 Bovine serum protein standard curve

2 结果与分析

2.1 发酵条件对菌株(Y_{20})产乳糖氧化酶能力的影响

2.1.1 发酵时间对菌株(Y_{20})产乳糖氧化酶能力的影响 改变发酵培养条件中的发酵时间,其他条件不变,考察发酵时间对菌株产乳糖氧化酶能力的影响,结果见图 2。在发酵 12~24 h 时,随着时间的推移,酶活逐渐增长;在发酵 24~60 h 时,随着时间的推移,酶活性缓慢降低;在发酵 24 h 时达到峰值,乳糖氧化酶活性为 70.24 U/g。

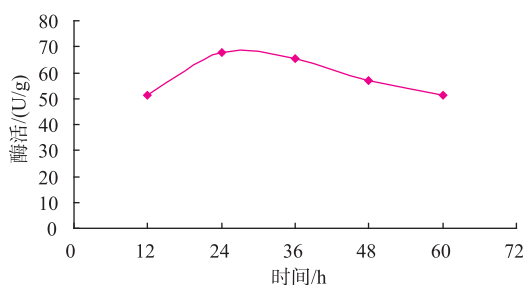


图 2 发酵时间对产乳糖氧化酶能力的影响

Fig. 2 Effect of fermentation time on lactose oxidase

2.1.2 发酵温度对菌株(Y_{20})产乳糖氧化酶能力的影响 改变发酵培养条件中的发酵温度,其他条件不变,考察发酵温度对菌株产乳糖氧化酶能力的影响,结果见图 3。发酵温度在 24~28 ℃时,随着温度的提高,酶活逐渐升高;发酵温度在 28~32 ℃时,随着温度的提高,酶活逐渐降低;在发酵温度 28 ℃时达到峰值,酶活为 73.19 U/g。

2.1.3 起始 pH 值对菌株(Y_{20})产乳糖氧化酶能力的影响 酸碱度对微生物的生长代谢有着重要影响,不同的微生物对酸碱有不同的适应性。确定了发酵液初始 pH 之后,在整个发酵过程中不再人为改变发酵液 pH 值的情况下,考察发酵过程中发酵液 pH

的变化对菌株(Y_{20})产乳糖氧化酶能力的影响。

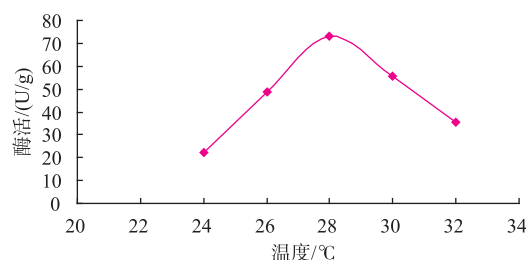


图 3 发酵温度对产乳糖氧化酶能力的影响

Fig. 3 Impact of fermentation temperature on lactose oxidase

不同的初始 pH 值不仅可以影响营养物质的可给性,同时也会影响代谢过程中酶的催化活性,进而影响到乳糖氧化酶活性。作者以 2% 的接种体积分数接种至不同 pH 值的发酵培养基中,发酵 24 h,测定乳糖氧化酶活性。由图 4 可知,在发酵液初始 pH 值为 7.0 时,乳糖氧化酶活性最高,因此确定该菌株的发酵初始 pH 值为 7.0。

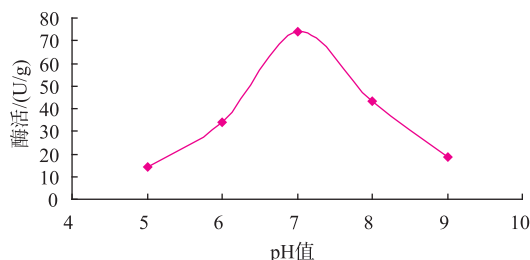


图 4 起始 pH 对产乳糖氧化酶能力的影响

Fig. 4 Effect of beginning of pH value on lactose oxidase

2.1.4 接种体积分数对菌株(Y_{20})产乳糖氧化酶能力的影响 接种体积分数的大小直接影响乳糖氧化酶活性,合适的接种体积分数不仅可以提高产物的合成速率,也有利于减少染菌机会。改变发酵培养条件中的接种体积分数,其他条件不变,考察接种体积分数对菌株产乳糖氧化酶能力的影响,结果见图 5。接种体积分数为 2% 时,发酵液中乳糖氧化酶活性最高;随着接种体积分数的增加,乳糖氧化酶活性开始下降,这主要是由于过高的接种体积分数使得菌体细胞的数量增殖过快,营养消耗过多,进而影响到代谢产物的生成量。

2.2 响应面法优化土生拉乌尔菌(Y_{20})产乳糖氧化酶的发酵条件

2.2.1 响应面设计及结果 为优化土生拉乌尔菌(Y_{20})产乳糖氧化酶发酵条件,采用经典的四因素三

水平 Box-Behnken 试验设计^[5],在单因素试验基础上,对发酵时间(A)、发酵温度(B)、初始 pH(C)、接种量(D)进行优化,具体方案及结果见表 1-2。

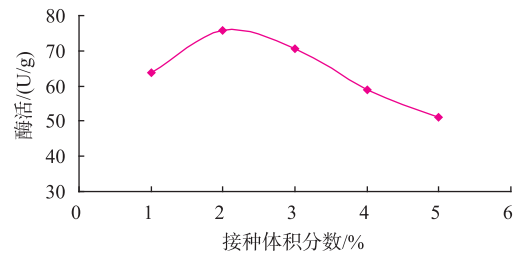


图 5 接种体积分数对产乳糖氧化酶能力的影响
Fig. 5 Impact of amount of inoculation on lactose oxidase

表 1 响应面试验因素水平表
Table 1 Factors and levels in response surface design

水平	发酵时间/h	发酵温度/℃	初始 pH 值	接种体积分数/%
-1	12	26	6	1
0	24	28	7	2
1	36	30	8	3

表 2 Box-Behnken Design 实验设计与实验响应结果
Table 2 Box-Behnken design and response result values

实验号	A	B	C	D	乳糖氧化酶活性/(U/g)
1	24	30	6	2	44.73
2	12	28	8	2	46.14
3	24	30	8	2	48.70
4	36	28	8	2	50.05
5	12	28	6	2	41.22
6	36	30	7	2	56.62
7	24	26	7	3	52.16
8	24	30	7	1	59.68
9	24	28	7	2	75.78
10	24	26	8	2	46.19
11	36	26	7	2	52.51
12	24	28	8	1	54.06
13	24	26	7	1	56.17
14	24	28	6	1	48.70
15	24	28	6	3	45.24
16	24	28	7	2	75.63
17	36	28	6	2	45.19
18	24	30	7	3	55.57
19	24	28	7	2	75.83
20	12	28	7	3	51.81
21	36	28	7	3	56.37
22	36	28	7	1	60.43

续表 2

实验号	A	B	C	D	乳糖氧化酶活性/(U/g)
23	24	28	7	2	75.48
24	24	26	6	2	40.07
25	12	30	7	2	51.20
26	24	28	7	2	75.58
27	12	26	7	2	48.60
28	12	28	7	1	56.32
29	24	28	8	3	49.25

2.2.2 模型评价 利用 Design-Exper7.0 软件对表 2 试验数据进行二次多项式逐步回归拟合,得到的数学模型为:

$$Y=75.66+2.16A+1.73B+2.44C-2.08D+0.38AB-0.01AC+0.11AD-0.54BC-0.03BD-0.34CD-11.48A^2-12.01B^2-18.59C^2-7.82D^2$$

模型方差分析结果和各项系数显著性检验结果列于表 3。

表 3 回归模型各项方差分析
Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3276.07	14.00	234.01	4 931.83	<0.000 1
A	55.80	1.00	55.80	1 176.12	<0.000 1
B	36.10	1.00	36.10	760.76	<0.000 1
C	71.24	1.00	71.24	1 501.37	<0.000 1
D	51.98	1.00	51.98	1 095.49	<0.000 1
AB	0.57	1.00	0.57	11.93	0.003 9
AC	0.00	1.00	0.00	0.01	0.910 0
AD	0.05	1.00	0.05	1.07	0.317 7
BC	1.16	1.00	1.16	24.50	0.000 2
BD	0.00	1.00	0.00	0.05	0.821 2
CD	0.46	1.00	0.46	9.66	0.007 7
A ²	854.65	1.00	854.65	18 012.34	<0.000 1
B ²	935.84	1.00	935.84	19 723.46	<0.000 1
C ²	2242.54	1.00	2242.54	47 263.25	<0.000 1
D ²	396.42	1.00	396.42	8 354.90	<0.000 1
残差	0.66	14.00	0.05		
缺失项	0.58	10.00	0.06	2.78	0.168 1
纯误差	0.08	4.00	0.02		
总和	3276.73	28.00			

从表 3 可以看出,土生拉乌尔菌产乳糖氧化酶活性影响的大小顺序为:初始 pH>发酵时间>接种体积分数>发酵温度。

模型中的 $F=4\ 931.83, P<0.05$, 说明本实验采取的二次模型是极显著的。 $P_A, P_B, P_C, P_{AB}, P_{BC}, P_{CD}, P_A^2, P_B^2, P_C^2, P_D^2$ 均小于 0.05, 说明取发酵时间、发酵温度、初始 pH 及其 4 个因素的二次项都具有显著的影响。决定因素 $R^2=0.999\ 8$, 也说明模型能够很好地反应响应值的变化, 拟合度好。

根据回归方程, 用 Design-Expert7.0 软件做出

响应面, 考察拟合响应曲面的形状。通过 Design-Expert7.0 软件优化功能再次优化, 结果见图 6—11。分别显示了发酵时间与发酵温度、发酵时间与初始 pH、发酵时间与接种体积分数、发酵温度与初始 pH、发酵温度与接种体积分数、初始 pH 与接种体积分数之间的相互作用对乳糖氧化酶活性的影响。

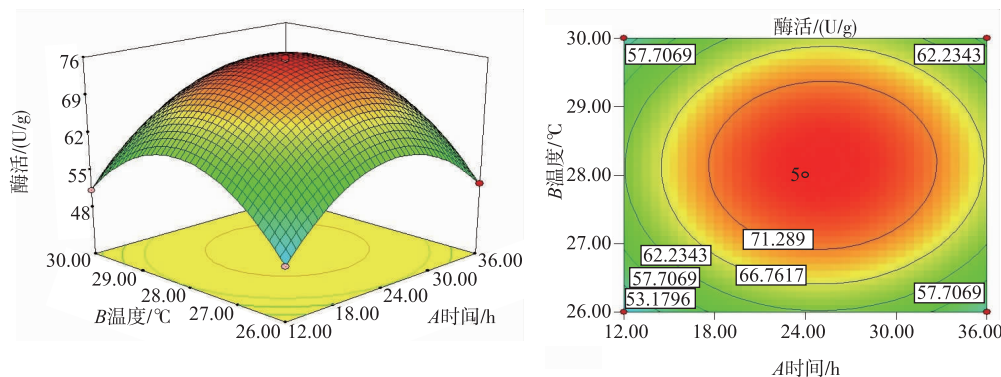


图 6 $Y=f(A, B)$ 的响应面和等高线图

Fig. 6 Respond figic and contour plot for $Y=f(A, B)$

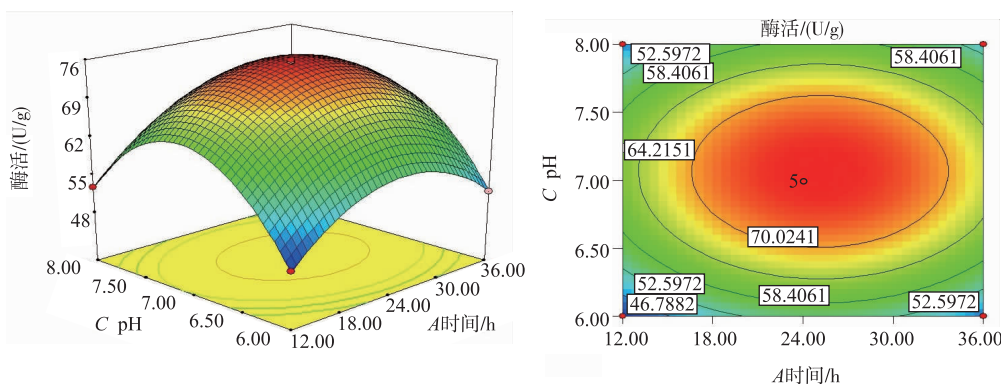


图 7 $Y=f(A, C)$ 的响应面和等高线图

Fig. 7 Respond figic and contour plot for $Y=f(A, C)$

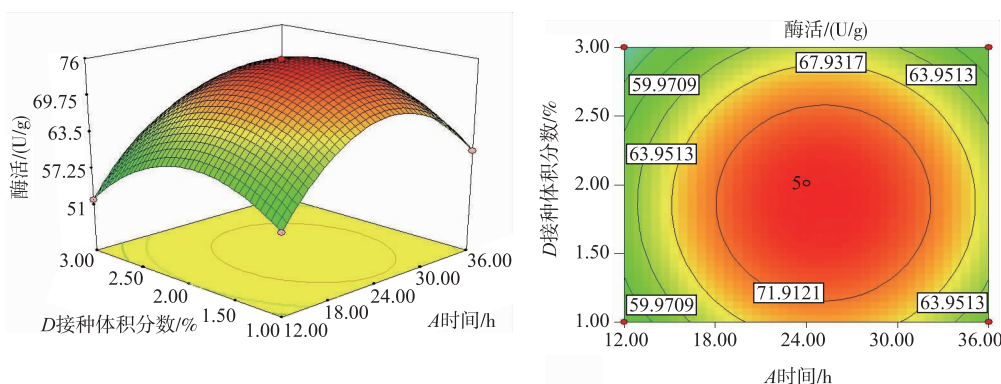
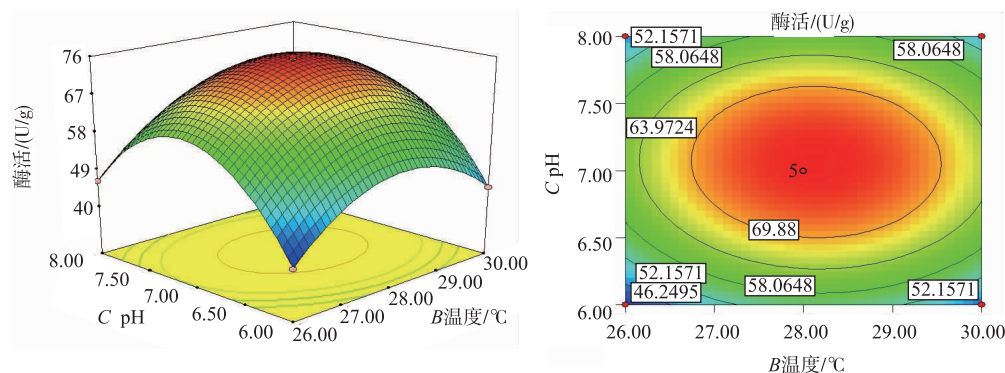
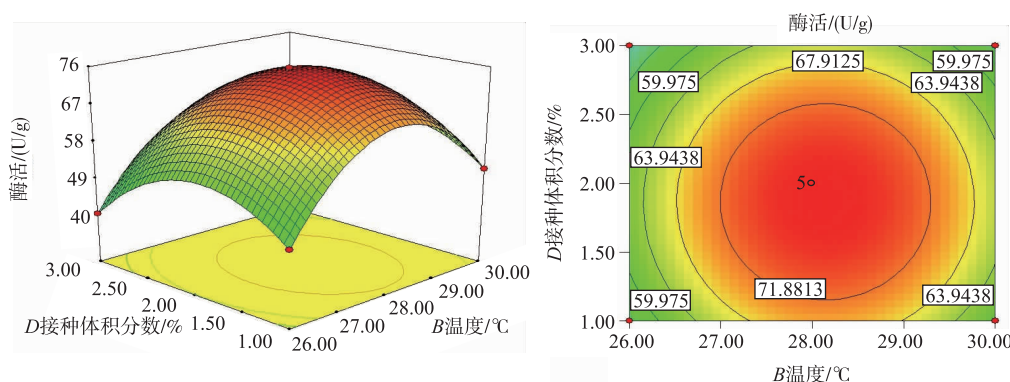
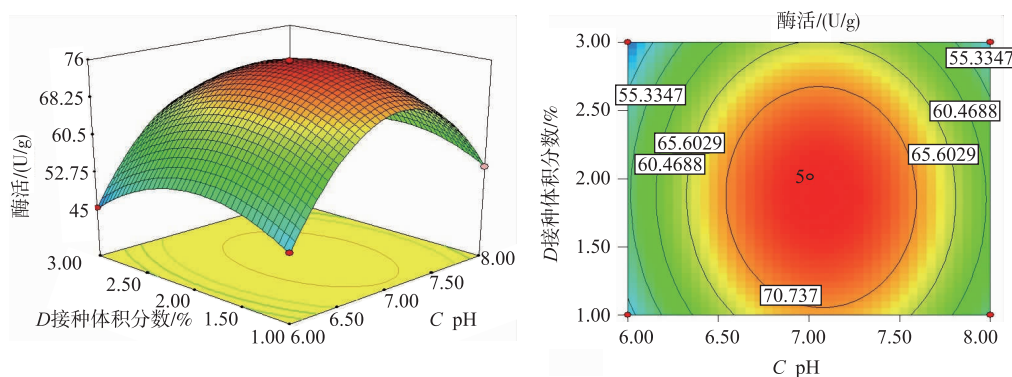


图 8 $Y=f(A, D)$ 的响应面和等高线图

Fig. 8 Respond figic and contour plot for $Y=f(A, D)$

图 9 $Y=f(B, C)$ 的响应面和等高线图Fig. 9 Respond fig and contour plot for $Y=f(B, C)$ 图 10 $Y=f(B, D)$ 的响应面和等高线图Fig. 10 Respond fig and contour plot for $Y=f(B, D)$ 图 11 $Y=f(C, D)$ 的响应面和等高线图Fig. 11 Respond fig and contour plot for $Y=f(C, D)$

由图 6—11 可以直观地看出各因素对响应值的影响及其变化趋势, 可以找出最佳参数。在所选的范围内存在极值, 而且回归模型确实存在最大值。乳糖氧化酶活性随着考察因素的逐渐增大而升高; 当继续增加超过实验取得的各因素的中心值时, 乳糖氧化酶活性随着考察因素的增加而降低。图 6 说明, 发酵时间与发酵温度、发酵温度与初始 pH、初始 pH 与接种体积分数之间有显著影响; 发酵

时间与初始 pH、发酵时间与接种体积分数、发酵温度与接种体积分数之间影响不够显著, 正如方差结果所示。

通过最优化分析, 最佳的发酵时间为 24.93 h, 最佳发酵温度为 28.13 ℃, 最适初始 pH 为 7.16, 最佳接种体积分数 1.88%, 预测乳糖氧化酶活性为 78.36 U/g。但考虑实际操作的限制性, 设定发酵时间为 25 h, 发酵温度 28 ℃, 初始 pH 为 7.2, 接种体

积分数为 2%。

2.2.3 验证响应面优化土生拉乌尔菌 (Y_{20}) 产乳糖氧化酶最佳发酵条件 在最优发酵条件下进行乳糖氧化酶发酵验证实验,实际酶活为 78.36 U/g,与预测的酶活 78.85 U/g 接近。

3 结 语

酶法生产乳糖酸始于 1998 年,乳糖在纤维二糖酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖果糖氧化还原酶等酶的催化下,通过二步法转化为乳糖酸。此法由于所用酶的底物专一性、稳定性等原因,始终难以和化学合成法及电转化法相抗衡。乳糖氧化酶和乳糖脱氢酶是最近几年来发现的两种能够直接将乳糖转化为乳糖酸的氧化还原酶类。虽然这两种酶均具有底物专一性强,转化率高的特点,但是由于乳糖脱氢酶是一种膜结合蛋白,分离纯化过程极其复杂,

且该酶容易失活,因而使其在酶法生产乳糖酸中失去竞争优势。乳糖氧化酶最初是在真菌中发现的一种以 FAD 为辅助因子的,能够将乳糖直接氧化成乳糖酸的一种氧化还原酶。该酶对乳糖具有较高的亲和性,且稳定性较高。关于产酶的微生物菌种及产酶条件的研究鲜少见报道。

作者考察了发酵时间、发酵温度、初始 pH、接种体积分数四个因素对土生拉乌尔菌 (Y_{20}) 产乳糖氧化酶的影响程度。模型拟合度较好,可对土生拉乌尔菌 (Y_{20}) 产乳糖氧化酶的影响因素起动态分析和最优结果预测的作用。通过 Design-Expert7.0 软件优化功能确证了本次实验考察因素的最优工艺参数,即最佳的发酵条件为:发酵时间 25 h,发酵温度 28 ℃,初始 pH 7.2,接种体积分数 2%,为土生拉乌尔菌 (Y_{20}) 产乳糖氧化酶氧化乳糖提供一定的条件。

参考文献:

- [1] DHARIWAL A, MAVROV V, SCHROEDE I. Production of lactobionic acid with process integrated electrochemical enzyme regeneration and optimization of process variables using response surface methods (RSM)[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2006, 42(1/2): 64-69.
- [2] Charloux C, Paul M, Loisan D, et al. Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol [J]. **Free Radical Bio Med**, 1995, 19: 699-704.
- [3] Gerling K G, Wilke D. Washing or detergent composition containing lactobionic acid or lactobionic acid salts [P]. US Patent 5069808, 1991-12-03.
- [4] KUUSISTOA J, TOKAREVA A V, MURZINA E V. From renewable raw materials to high value-added fine chemicals: catalytic hydrogenation and oxidation of D-lactose[J]. **Catalysis Today**, 2007, 121(1/2): 92-99.
- [5] Feng Xu, Elizabeth J Golightly, Claus C Fuglsang, et al. A novel carbohydrate: acceptor oxidoreductase from *Microdochium nivale* [J]. **Eur J Biochem**, 2001, 268(4): 1136-1142.
- [6] Ahmad S K, Brinch D S, Friis E P, et al. Toxicological studies on lactose oxidase from *Microdochium nivale* expressed in *Fusarium venenatum*[J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2004, 39(3): 256-270.
- [7] Lin S F, Hu H M, Inukai T. Production of novel oligosaccharide oxidase by wheat bran solid-state fermentation [J]. **Biotechnol Adv**, 1993, 11(3): 417-427.
- [8] 白会钗, 缪铭, 江波, 等. 乳糖酸的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012(2): 430-436.
BAI Huichai, MIAO Ming, JIANG Bo, et al. Review on research progress of lactobionic acid [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012(2): 430-436. (in Chinese)
- [9] Zhou X, Zheng Y, Ye H M, et al. Fermentation medium optimization of thermophilic proteinase by response surface methodology [J]. **Journal of Biomathematics**, 2007, 22(1): 113-118.
- [10] Kalil S J, Maugeri F, Rodrigues M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization[J]. **Process Biochemistry**, 2000, 35(6): 539-550.
- [11] Ramkrishna S, Swaminathan T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2004, 21(2): 141-148.
- [12] 郑艳, 李超. 乳糖酸生产菌株的筛选与鉴定[J]. 食品工业科技, 2012, 34(4): 189-192.
ZHENG Yan, LI Chao. Screening and identifying lactobionic acid producing bacteria strain[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 34(4): 189-192. (in Chinese)