

SHIPINMEI JISHU JIQI SHIJIAN YINGYONG YANJIU

食品酶技术

及其实际应用研究

魏 涛◎著

张外借



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

食品酶技术

及其实际应用研究

魏 涛◎著



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

·北京·

内 容 提 要

本书在论述食品酶技术基本理论的基础上,较为全面地阐述了酶技术在食品工业各领域中的广泛应用,主要内容包括:酶学基础理论、酶的合成与发酵生产技术、酶的提取与分离纯化技术、酶固定化技术、酶分子改造和修饰、食品工业中常见酶及其应用、酶技术在食品领域的应用等。

本书融合大量的实际应用和酶领域最新技术,理论与实践相结合,实用性强,并融科学性、前沿性、系统性和通俗性于一体,具有较强的可读性,可供食品科研、食品生产等部门的有关技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

食品酶技术及其实践应用研究/魏涛著. — 北京:中国水利水电出版社,2018.8

ISBN 978-7-5170-6881-5

I. ①食… II. ①魏… III. ①食品工艺学—酶学—研究 IV. ①TS201.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 215643 号

书 名	食品酶技术及其实践应用研究 SHIPINMEI JISHU JI QI SHIJIAN YINGYONG YANJIU
作 者	魏 涛 著
出版发行	中国水利水电出版社 (北京市海淀区玉渊潭南路1号D座100038) 网址:www.waterpub.com.cn E-mail:sales@waterpub.com.cn 电话:(010)68367658(营销中心)
经 售	北京科水图书销售中心(零售) 电话:(010)88383994、63202643、68545874 全国各地新华书店和相关出版物销售网点
排 版	北京亚吉飞数码科技有限公司
印 刷	三河市元兴印务有限公司
规 格	170mm×240mm 16开本 17印张 220千字
版 次	2019年3月第1版 2019年3月第1次印刷
印 数	0001—2000册
定 价	82.00元

凡购买我社图书,如有缺页、倒页、脱页的,本社营销中心负责调换

版权所有·侵权必究

前 言

人们对酶的认识起源于对发酵机理的探索。100年前,法国著名微生物学家巴斯德对酒精的发酵机理作出了理论的解释,他认为酒精的发酵是酵母活细胞引起的,并提出了“生机论”的观点,对此观点,有人提出了异议。1897年,德国生物学家巴赫纳兄弟使用石英砂磨碎酵母细胞,过滤后得到酵母细胞抽提物,添加蔗糖后发现,酶离开活细胞也可以起到催化作用,这一发现具有划时代意义。此后,人们对酶的认识进一步加深,酶的催化功能以及酶的蛋白质本性相继被发现。

现代酶学研究的是酶在细胞内的生物合成机理、酶的发酵生产及调节控制、酶分子提纯、酶的作用特性与反应动力学、酶的催化作用机制、酶的固定化技术、酶的分子修饰、酶的蛋白质分子改性以及酶的应用。本书从现代酶学出发,系统阐述了食品酶技术以及其应用研究。全书分为8章,分别是绪论、酶学基础理论、酶的合成与发酵生产技术、酶的提取与分离纯化技术、酶固定化技术、酶分子改造和修饰、食品工业中常见酶及其应用、酶技术在食品领域的应用。第一部分为绪论,着重讲述酶的发展历程以及酶的分类与命名。第二部分包括第二章至第六章,讲述的是酶学的基础,主要包括酶的催化机理、酶的生物合成过程与酶的分离、纯化、固定化与修饰等技术,这部分为本书的重点。第三部分包括第七章、第八章,主要讲述了食品工业中常见的酶以及酶在食品产业化过程中的应用。

除了食品领域,酶在医药、轻工、化工、环境保护、生物技术方面都有广泛的应用,可见酶的作用是十分巨大的,可以肯定,酶的

应用还将进一步扩展。

本书在撰写过程中,参考了大量的文献和资料,在此我对本书的参考文献的作者表示衷心的感谢。

由于作者水平有限,写作过程中难免有疏漏和不足之处,望广大读者见谅,还希望你们能够提出宝贵的意见,谢谢你们!

作 者

2018年6月

目 录

前言

第一章 绪 论	1
第一节 酶的概况	1
第二节 食品酶学的定义及发展	2
第三节 酶的分类和命名	8
第四节 我国食品加工用酶制剂企业良好生产规范	13
第五节 食品酶技术的发展前景	17
第二章 酶学基础理论	20
第一节 酶的特性	20
第二节 酶的结构与功能	21
第三节 酶作用的专一性机制	38
第四节 酶的催化作用机制	40
第五节 影响酶促反应的因素	50
第六节 酶反应速度的测定	53
第七节 缬氨酸转氨酶拆分 DL-缬氨酸的催化条件	58
第三章 酶的合成与发酵生产技术	63
第一节 酶蛋白合成过程(机制)	63
第二节 酶发酵生产常用微生物	67
第三节 微生物发酵产酶工艺	74
第四节 α -胡萝卜素降解产香菌株的分离、鉴定 及发酵条件优化	84
第五节 根霉 ZZ-3 脂肪酶发酵条件的优化 及酶学性质研究	96
第四章 酶的提取与分离纯化技术	104
第一节 细胞分离与破碎	104
第二节 酶的抽提	109

第三节	酶溶液的浓缩	112
第四节	酶的分离纯化	116
第五章	酶固定化技术	133
第一节	酶的固定化	133
第二节	固定化酶的特性	138
第三节	固定化酶的催化反应机理	140
第四节	酶催化反应器	143
第五节	固定化酶的应用	152
第六节	共固定化技术	157
第六章	酶分子改造和修饰	161
第一节	采用蛋白质工程技术修饰酶	161
第二节	酶的有限水解修饰技术	169
第三节	酶的氨基酸置换修饰	172
第四节	酶的亲和标记修饰	174
第五节	酶的大分子结合修饰	176
第七章	食品工业中常见酶及其应用	178
第一节	淀粉酶	178
第二节	蛋白酶	186
第三节	脂酶	199
第四节	新型酶剂的开发和应用	210
第八章	酶技术在食品领域的应用	227
第一节	酶在焙烤食品加工中的应用	227
第二节	酶在葡萄糖生产中的应用	229
第三节	酶在油脂生产中的应用	237
第四节	酶在果蔬食品、果汁加工中的应用	241
第五节	酶在肉制品和水产食品加工中的应用	244
第六节	酶在乳品工业中的应用	246
第七节	酶在酒类生产中的应用	247
第八节	酶在食品保鲜方面的应用	251
第九节	酶在食品分析方面的应用	256
参考文献		264

第一章 绪 论

现代生活中琳琅满目的食品,其最初的加工原料主要来源于生物材料。生物,无论动物、植物还是微生物,区别于非生物的核心特征是其具有生命活动,新陈代谢是生命活动最重要的特征。新陈代谢中各种化学反应都是在酶的作用下进行的,酶是促进一切代谢反应的物质,没有酶,代谢就会停止,生命也即停止。

酶工业是现代工业的重要组成部分,在食品工业领域,酶制剂的生产和应用具有非常重要的地位:食品原料的贮藏、保鲜、改性,食品加工工艺的改进,食品品质的提高等都离不开酶学与酶工程。因此,研究学习食品酶学与酶工程的理论与技术具有重要的理论及实践意义。

第一节 酶的概况

人们对于酶的认识和酶学的发展起源于人类的生产实践,在生产劳动过程中,人们逐渐意识到酶的作用,于是酶的理论研究也就随之产生并发展起来。

酶的应用可以追溯到几千年前,但对酶的真正发现和对酶本质的认识直到 19 世纪中叶才开始起步,随着现代科技的发展和人们对酶本质认识的不断深化,酶的定义也不断变化。Dixon 和 Webb 在 1979 年的著作中对酶定义为:“酶是一种由于其特异的活性能力而具有催化特性的蛋白质。”综合 20 世纪 80 年代之前的研究结果,这可能是最好、最科学的定义,它不但明确了酶的蛋

白质属性及其具有的特殊生物催化功能,而且也是一个有实用价值的定义,通过此定义可以研究酶的活性原理和应用,特别是与现在和将来食品工业中酶的应用有关的一些基本问题。但在 20 世纪 80 年代初,Cech 和 Ahman 等分别发现了具有催化功能的 RNA-核酶(ribozyme),不但打破了酶是蛋白质的传统观念,开辟了酶学研究的新领域,同时基于这一研究结果,酶的定义也须做一定的修改。因此有理由重新对酶下一个更加科学的定义:酶是由生物活细胞所产生的、具有高效和专一催化功能的生物大分子。需要指出的是“酶”的传统术语还将在一般情况下使用,特别是以蛋白质的特性来描述生物催化作用时,尤其在食品工业中现在和可预见的将来所使用的所有酶都是蛋白质。

第二节 食品酶学的定义及发展

一、食品酶学的定义

食品酶学(food enzymology)是酶学基本理论在食品工业与技术中的应用的科学,是酶学的一个重要分支学科。酶学是生物科学和食品科学的基础,懂得酶学才能理解酶在动植物原料及其加工过程中的变化和作用,才能理解食物在体内的生理作用和营养功能。此外,酶对食品质量(包括食品的感官指标、理化指标及卫生要求等)的影响是很大的,有可能产生好的效果,也有可能产生坏的作用。食品酶学主要内容包括酶学基础理论、食品工业中应用的水解酶类、食品工业中应用的氧化酶类及其他酶类等。

食品酶学的重要特点是基础酶学和食品工程学相互渗透,它是将酶学、食品微生物学的基本原理应用于食品工程并与酶工程有机结合而产生的交叉科学技术。酶学、食品酶学与酶工程三者含义有所不同,但它们之间又能有机联系、互相渗透。特别是现

代生物工程的兴起和发展,极大地丰富了酶学和食品酶学的研究内容。酶工程(enzyme engineering)是生物工程的重要组成部分,是从规模生产角度,采用酶催化技术,在生物反应器中控制性地将原料成分转化为人类所需要产品的工程技术。

当今,酶工程的发展日新月异,并与现代基因工程(gene engineering)、蛋白质工程(protein engineering)、发酵工程(fermentation engineering)和细胞工程(cell engineering)紧密结合,对于改良产酶的菌种和采用细胞固定化技术等新技术,改造传统的食品、发酵、医药和环保工业等均起着越来越重要的作用。从现代酶工程发展角度而言,酶工程又可分为化学酶工程和生物酶工程。前者包括固定化酶(细胞)、酶的化学修饰和有机溶剂中酶的催化作用等内容,而后者则包括核酸酶、酶分子定向进化和抗体酶等。总之,酶学与酶工程将为改造传统的食品工业、发展社会经济提供极大的帮助。

二、食品酶学发展简史

任何一门科学都有其一定的形成和发展历程,而且与其他科学的发展紧密相关。食品酶学的发展,可划分为史前时期、近代发展、现代食品酶学发展 3 个时期。

(一) 史前时期

人类应用酶的催化作用的历史可谓源远流长。我国早在夏禹时代已盛行酿酒,“曲”(即今天的酶)的发现功不可没。另据记载,公元前 12 世纪能制饴、制酱。《书经》记载“若作酒醴,尔惟曲蘖”,“曲”是指长霉菌的谷物,“蘖”是指谷芽。《左传》一书也记载有用“曲”“蘖”治病等内容。

现代科学证明,“曲”和“蘖”均富含淀粉酶、糖化酶及附着天然的酵母菌,可以将淀粉水解成发酵性糖,再由酵母发酵成酒精。用大豆制酱是我国先民对人类文化的一个伟大贡献,秦汉以前的

人们已掌握了利用微生物制造美味豆酱的技术。而饴糖是麦芽淀粉酶作用于淀粉分子使之转变而成的,近 3 000 年前的《诗经·大雅》中提到了“饴”字。到了北魏,贾思勰著的《齐民要术》已详细叙述了制曲和酿酒的技术。我国制曲技艺先后传至朝鲜、日本、印度和东南亚各国。日本著名科学家坂口谨一郎认为,“中国制曲应用于酿酒,可与中国古代四大发明相媲美”。这些都说明酶学起源于我国古代劳动人民的生产实践和中华民族光辉灿烂的历史文化。

(二) 近代发展

1876 年德国学者 Kühne 首先引用“enzyme”一词。1897 年 Büchner 兄弟俩阐述了酵母酒精发酵及离体酶的作用,这一科学的发现为酶制剂产业化奠定了理论基础。1902 年 Pikelharing 提取出胃蛋白酶。1909 年德国 Rohm 制取胰酶应用于制革,并用于洗涤剂。1908 年法国学者 Boidin 制得了细菌淀粉酶,用于纺织退浆。1911 年美国 Wallestein 制得木瓜蛋白酶,用于啤酒澄清。1926 年美国 Sumner 从刀豆中制得结晶脲酶,证实酶的化学本质是蛋白质,为研究酶学奠定了基础。

从 20 世纪 30 年代开始酶学发展很快。1930—1936 年, Northrop 等人制取出胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的结晶。Hill 和 Meyerhof 等提出了糖酵解途径;Krebs 等人发现了三羧酸循环及脂肪酸氧化降解途径,并指出这些复杂的新陈代谢途径是由一系列酶催化而实现的。

随着生化技术不断进步,新酶的不断发现和开发,人们对于酶作为工业催化剂的价值有了认识,并且了解到许多酶是可以用微生物发酵生产的。随后,特别是第二次世界大战后抗生素工业的兴起,酶制剂在食品、医疗、化工和环境等领域的应用,酶制剂工业才有了飞跃发展。

(三) 现代食品酶学发展

20 世纪中叶,已由微生物发酵制得了酶制剂,并在工业上大

规模应用。1949年,由于日本采用深层培养法生产细菌 α -淀粉酶获得成功,酶制剂进入工业化生产阶段。此后,蛋白酶、果胶酶、转化酶等相继投入市场。1959年,由于采用葡萄糖淀粉酶催化淀粉的新工艺研究成功,彻底改变了原来葡萄糖生产中需要的高温高压的酸水解工艺,这项改革的成功,大大促进了酶在工业上的应用发展。1969年日本第一次将固定化酶成功地应用于工业生产,标志着酶工程的诞生。进入20世纪70年代,酶和细胞的固定化技术已用于分析和临床化验。1970年美国的Smith发现了限制性内切酶。1971年召开第一届酶工程国际学术研讨会,统一规定固定化酶即一种修饰酶,并将其称为第二代酶工程。随后又有以固定化多酶反应器为特点的第三代酶工程。再然后,便出现了“化学酶工程”“生物酶工程”“分子酶工程”或“酶分子工程”等术语;同时由于基因工程的鹊起,又有“工程酶”这一术语出现。1982年,T. Cech发现了他称之为ribozyme的RNA催化剂(核酶)。至20世纪90年代初,新的研究热点如抗体酶或催化抗体的研制,酶在非水介质中的反应的研究,溶剂工程研究,杂合酶、进化酶研究等,频频登台。现代酶工程的概念因此应运而生。1994年,A. Break等又发现了可以切割RNA的DNA酶,并称为deoxyribozyme(脱氧核酶)。近20年来,由于蛋白质工程、基因工程和计算机信息等技术的发展,使酶工程技术得到了迅速发展和应用。

现代食品酶学发展有如下几个新的突破:

1. 酶及细胞固定化技术的开发应用

作为一种催化剂,在催化过程中自身不发生变化,可以反复使用。但是酶是水溶性的,不易回收,其提纯比较困难,有些酶反应尚需三磷酸腺苷(ATP)及辅酶,后者价格昂贵,这些都限制了酶的使用范围。若用物理或化学方法将酶与不溶性载体结合而固定化,便可以从反应体系中回收而重复使用,并且可以装入反应器进行连续化反应,那么不仅酶不会进入产品,而且可以节约

酶的用量,有利于产品的提纯,反应器也可大大缩小。

2. 基因工程与高新技术的应用

20世纪50年代初分子生物学的诞生,70年代初基因工程的诞生和生物工程的兴起,大大地推动了食品酶工程的发展。当今,许多产酶微生物菌种的选育不仅靠传统的物理、化学方法,而且采用基因工程技术改造的菌种,其产酶活力及其稳定性远远超过传统方法改造的菌种。世界上最大的酶制剂生产企业诺维信(Novozyme)公司所生产的酶制剂约有75%以上是通过基因工程改造过的菌种(称为工程菌)生产的。同时酶的分子修饰及提高酶的稳定性,其最新研究成果也离不开基因工程和蛋白质工程等高新技术的应用。

3. 传统的生物催化理论受到挑战

在20世纪80年代初以前,学术界一直认为,酶的化学本质是蛋白质。但是,1982年美国科罗拉多大学博尔德分校的Thomas Cech研究四膜虫(tetrahymena)细胞内26s rRNA转录加工时发现,并一再研究证实RNA也具有催化活性,从而改变了酶化学本质的传统概念。

核酶的结构改性和固定化技术也已陆续有成功的报道,并已在工业上、医学上获得应用。例如,将核酶构建于特定载体上,在爪蟾卵母细胞、Hela细胞等已表达成功,产生的核酶能阻断特定基因(氯霉素酰基转移酶基因等)的表达,在医疗保健等领域具有应用前景。

4. 抗体酶的发现

1986年美国R. A. Lerner研究组、P. G. Schutz研究组研究发现有一种具有催化功能的抗体分子,这种分子称为抗体酶(abzyme),它是antibody与enzyme的组合同。抗体酶又称为催化性抗体(catalytic antibody)。

随着抗体酶研究的发展,将进一步拓宽催化反应和蛋白质改性的应用范围,特别是对那些天然酶不能催化的反应,则可制备抗体酶来进行催化。在医学上可用于诊断和治疗,在有机合成中抗体酶可解决外消旋混合物对映体的拆分等难题,也可应用于生物传感器和食品安全的检测。现在,抗体酶技术已受到国内外高度重视,美国 IGEN 公司已实现抗体酶技术商品化。

5. 酶的非水相催化作用

1984 年美国麻省理工学院以 Klibanov 教授为首的研究小组,建立了非水酶学(nonaqueous enzymology)分支学科,在界面酶学和非水酶学的研究取得突破性进展,极大地促进了脂肪酶多功能催化作用的开发。随着油脂加工业的发展和脂肪食品的开发,有机相的生物催化成为当今酶工程的研究热点。

6. 酶的定向进化改性研究

当今,蛋白质工程对酶的修饰改造引起广泛关注,从定位突变到定向进化取得一系列研究成果。研究表明,通过酶的定向进化,在体外进行基因的人工随机突变,建立突变基因文库,在人工控制条件的特殊环境下,定向选择得到具有优良催化特性酶的突变体的技术过程。2004 年 A. Aharoni 等采用基因家族分子重排定向进化技术使大肠杆菌磷酸酶活力提高 40 倍。

7. 新酶源开发和极端酶的研究

自然界中有数亿种微生物,但是,人们已经发现和正在利用生产酶的微生物还不到 1%。近年来,人们从生产实践出发,非常重视新酶源的开发。同时,对极端环境微生物,特别是对耐高温微生物生产酶的开发,并在生产过程中应用具有重要学术价值和经济意义。

8. 酶在食品行业的应用促进酶工程产业化的形成和发展

20 世纪 70 年代初,美国实现酶的固定化应用于玉米淀粉酶

促降解转化为高果糖浆,并应用于饮料代替蔗糖作为甜味剂。70年代末,我国成功地采用 α -淀粉酶和糖化酶“双酶法”代替酸法从淀粉水解生产葡萄糖,彻底革除了原来葡萄糖生产中需要高温高压的酸水解工艺。后来,又相继成功地采用酶法生产麦芽糖、超高麦芽糖、功能性寡糖等。同时,大规模开展了固定化细胞、增殖性固定化研究并根据酶反应动力学理论,研究设计了多种类型的酶反应器,逐渐形成了较完整的酶工程。

9. 酶工程在节能减排、循环经济和“三废处理”等方面应用的突破性进展

除汽油外,乙醇也是重要能源。在世界性的石油危机面前,乙醇汽油(在汽油中掺入10%乙醇)受到越来越多的关注。纤维素是最丰富的再生资源,植物通过光合作用利用太阳能生产大量的纤维素类物质。20世纪70年代开始进行纤维素酶的开发和应用,现在已能成功地应用纤维素酶把一些纤维废弃物如稻草、麦秸、锯木屑和蔗渣等转化为葡萄糖,然后再用酵母菌进行酒精发酵。

食品企业存在着大量“三废”(废气、废水和废渣)。大豆蛋白制品厂在加工生产分离蛋白后,剩余的“下脚料”含有丰富的可溶性膳食纤维,现在已能采用酶法分离并喷雾干燥制成优质的可溶性膳食纤维,应用于各种保健食品的生产。此外,屠宰和禽畜加工厂有大量的骨骼下脚料,同样可采用酶工程技术制备出各种营养品,如骨蛋白、骨奶、骨粉、骨素和骨泥食品,均可“变废为宝”。

第三节 酶的分类和命名

酶(enzyme)在希腊语里是存在于酵母中(in yeast)的意思。也就是在酵母中各种各样进行着生命活动的物质被发现,然后被这样命名。但是酶不等于酵母。酵母是单细胞微生物,内含有许多酶,酵母具备细胞组织。

一、酶的分类

(一) 蛋白类酶的分类

作为大的分类,酶类分为“分解系酶”和“合成系酶”。为了区分身体组织内和身体组织外被使用的酶,称在身体组织内被使用的酶为“代谢酶”,称在肠胃内等身体组织外被使用的酶为“消化酶”。在生物化学上,国际酶学委员会(IEC)规定,按酶促反应的性质,可把酶分成六大类,分别用1、2、3、4、5、6的编号来表示,依次为氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶和合成酶六大类。再根据底物分子中被作用的基团或键的特点,将每一大类分为若干个亚类,每一亚类又按顺序编为若干亚亚类。均用1、2、3、4……编号,见表1-1。

表 1-1 酶的国际系统分类原则

第1位数字 (大类)	反应的本质	第2位数字 (亚类)	第3位数字 (亚亚类)	占有 比例/%
1. 氧化还原酶类	电子、氢转移	供体中 被氧化的基团	被还原的受体	27
2. 转移酶类	基团转移	被转移的基团	被转移的 基团的描述	24
3. 水解酶类	水解	被水解的键: 酯键、肽键等	底物类型: 糖苷、肽等	26
4. 裂解酶类	键裂开*	被裂开的键: C—S, C—N 等	被消去的基团	12
5. 异构酶类	异构化	反应的类型	底物的类别, 反应的类型 和手性的位置	5
6. 合成酶类	键形成并使 ATP 裂解	被合成的键: C—C, C—O 等	底物类型	6

* 键裂开指的是非水解地转移底物上的一个基团而形成双键及其逆反应。

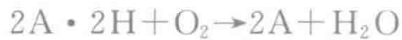
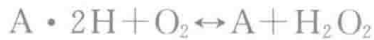
1. 氧化还原酶类

氧化还原酶类指催化底物进行氧化还原反应的酶类,可分为氧化酶和还原酶两类。例如:乳酸脱氢酶、细胞色素氧化酶、过氧化氢酶等,反应通式为



(1) 氧化酶类。

催化底物脱氢,氧化并生成 H_2O_2 或 H_2O 。



(2) 脱氢酶类。

催化直接从底物上脱氢的反应。



2. 转移酶类

转移酶类催化某一化合物上的某一基团转移到另一个化合物上,反应通式为



该大类酶根据其转移的基团不同,分为 8 个亚类。每一亚类表示被转移基团的性质。如转移氨基、羰基、酰基、磷酸基等。

3. 水解酶类

水解酶类指催化底物发生水解反应的酶类,如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等。这类酶在体内担负降解任务,其中许多酶集中于溶酶体,反应通式为



碱性磷酸酯酶专一性较低,在碱性 pH 下能作用于各种底物。

4. 裂解酶类

裂解酶类指催化一个底物分解为两个化合物或两个化合物