

一、食品酶制剂的基本知识

今日的科学已经证实酶是活细胞合成的一种生物催化剂。它存在于一切生物体中，参与物质代谢的每个过程，起着各种高效的催化作用。从组织细胞中提取的酶在合适的条件下仍可以独立存在、发挥催化作用，这样使酶就有了实际应用的前途。

但是酶的应用不是今天才有的，可追溯到4000多年前我国夏禹时代。我们的祖先那时并不知道酶是怎样的物质，却凭着实践中积累的经验，利用自然的生物酶酿酒、制酱、制醋和制饴糖。人类通过长期的生产实践和科学研究逐渐丰富了酶学知识。1878年威廉·屈内(Kühne)首次提出酶(enzyme)这一名称。1897年布切诺(Buchner)成功地用不含细胞的酵母提取液，实现了与酵母菌一样的发酵，即将葡萄糖转化成乙醇和二氧化碳，这就证明了这种转化不是酵母本身，而是由酵母细胞内的酶类引起的。到了20世纪初，酶学研究取得了迅速进展。1926年塞姆纳(Sumner)第一次从刀豆得到脲酶结晶。此后，许多种酶被陆续结晶出来。尤其应该指出的是，1949年日本开始用深层培养技术生产细菌 α -淀粉酶后，使微生物酶制剂生产进入大规模工业化阶段。至今，工业上有价值的酶已有五六十种。酶制剂工业的一个特点是本身产值不大，但对社会的贡献大；世界酶制剂总销售额才五亿多美元，却推动了许多工业的发展。我国的酶制剂工业始于60年代初，目前已经在14个省、直辖市、自治区建

立了酶制剂生产体系。据1985年统计，全国酶制剂产量约2.2万吨。酶制剂广泛地应用于食品、医药、纺织印染、造纸、制革和部分化学工业方面，其中在食品加工方面的应用居首位。

(一) 什么是酶

(1) 酶是蛋白质 酶是一类具有特殊催化功能的蛋白质。它存在于活细胞中控制各种代谢过程，将营养物质转化成能量和细胞构成材料。迄今为止，从生物材料中分离、鉴定出的二千多种酶都是蛋白质。它与其他蛋白质一样，基本组成单位是氨基酸，并且由肽键相连形成氨基酸长链，具有一、二、三级乃至四级结构。

酶按其分子组成可分为两大类。一类是单纯酶，其基本组成只是氨基酸，它的催化活性仅取决于蛋白质的结构。另一类是结合酶，它除蛋白质以外，还有非蛋白部分，这两部分对酶的催化活性缺一不可。我们把蛋白质部分称酶蛋白，非蛋白部分称辅助因子，两者结合后形成的复合物称全酶。非蛋白部分属于金属离子的有钠 (Na^+)、钾 (K^+)、镁 (Mg^{2+})、锌 (Zn^{2+})、铁 (Fe^{2+})、铜 (Cu^{2+} 或 Cu^+)等，属于有机化合物的有维生素或维生素类物质。

酶具有蛋白质的一切理化性质。它也是亲水胶体，具有两性电解质性质，凡能引起蛋白质变性的因素均可致使酶失活。

(2) 酶是生物催化剂 酶既具有一般化学催化剂的共性，又具有它本身的特性：(1) 凡是催化剂均能加快化学反应的速度，而本身在反应前后都没有结构和性质上的改

变。(2)只能催化热力学上允许进行的化学反应,而不能实现热力学上不能进行的反应。(3)只能缩短反应达到平衡所需的时间,而不能改变平衡点。

酶与一般化学催化剂的不同点:一是酶的催化反应一般都在温和的pH、温度条件下进行。强酸、强碱、重金属盐、有机溶剂、高温、剧烈搅拌、紫外线等致使蛋白质变性的因素都可使酶失去催化活性。二是酶对底物有高度的特异性。所谓底物即是酶催化的反应中的反应物。酶的特异性是指一种酶只能作用于一种底物,或一类化合物或一定的化学键或一种异构体,催化一定的化学反应并生成一定的产物。三是催化效率高。一般而言,酶促反应速度比一般催化剂的催化反应高 $10^7\sim 10^{15}$ 倍。例如,1克 α -淀粉酶结晶品,在 65°C 15分钟可使2吨淀粉转化成糊精。

(二) 酶的来源和安全要求

食品酶制剂是专用于食品加工的,主要来源于高等植物的种子和果实,动物的内脏和腺体,以及某些微生物如酵母、霉菌、杆菌等的控制培养物。目前,已经商品化的酶制剂中,植物来源的蛋白酶有木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶,还有从麦芽中提取的 β -淀粉酶。动物来源的酶制剂有:从猪、羊、牛、家禽的胰脏中提取的胰蛋白酶、弹性蛋白酶;从其肠胃消化器官中提取的胃蛋白酶、凝乳酶;从鸡蛋清中提取的溶菌酶。微生物来源的酶制剂是商品酶的主体,如 α -淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、葡萄糖氧化酶,脂肪酶、果胶酶等十多种。

以上不同来源的酶制剂，其组成可以是所用材料的整细胞、部分细胞或无细胞提取液。剂型为固体、半固体或液体。颜色从无色至暗棕色。一般说，酶制剂是一种复合产品，含一种或多种的活性成分以及稀释剂、防腐剂、抗氧化剂和其他物质。活性成分由具有生物活性的蛋白质组成，同时，偶联金属、碳水化合物和类脂，分子量范围约1万至几十万。其他的添加剂和配料必须为可用于食品的物质，或者在加工过程中不溶解和加工以后可以除去的物质。

关于食品酶制剂的安全要求，联合国农业粮食组成（简称FAD）和世界卫生组成（WHO）的食品添加剂专家联合委员会（简称JECFA），于1977年第21届大会上作出以下规定：

（1）凡从动植物可食部位的组织，或用食品加工传统使用菌种生产的酶制剂，可作为食品对待，不需进行毒理试验，只需建立有关酶化学和微生物学的说明。

（2）凡由非致病性一般食品污染微生物生产的酶，需作短期毒性试验。

（3）对于非常见微生物制取的酶，要作广泛的毒性试验。

用于生产食品酶制剂的工业菌种，必须是非致病性的，不产生毒素、抗生素、激素等生理活性物质的，必须通过各种安全性试验，证明安全可靠，才能批准使用。美国、日本、苏联等国家对酶制剂生产菌种都有限制范围。如美国政府同意使用的食品酶制剂生产菌种只限于黑曲霉、米曲霉、根霉、微小毛霉、面包酵母、脆壁酵母、枯草杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、橄榄色链霉菌、米苏里游动放线菌等

十几种微生物。英国食品化学法典规定了食品酶制剂的安全检测项目和限量，见表1。

表1 食品酶制剂的安全检查

项 目	限 量
重金属	<40ppm
Pb	<10ppm
As	<3ppm
黄曲霉毒素	不准含有
活菌数(个/克)	<5×10 ⁴
大肠杆菌(个/克)	不准含有
霉菌(个/克)	<100
绿脓杆菌	不准含有
沙门氏菌	不准含有

此外，对食品酶制剂还作出其他卫生学的规定：（1）按照良好的食品制造技术生产酶制剂。（2）根据各种食品的微生物卫生标准，用酶制剂加工的食品必须不引起微生物总量的增加。（3）用酶制剂加工的食品必须不带入或不增加危害健康的杂质。

（三）酶活性的测定

1、活性的概念及其表示的单位 任何一种酶都有催化一定的底物进行特定反应的能力。酶的活性是指在一定条件下酶催化一定化学反应的能力。这里说的一定条件是指某种

酶作用最适的、能充分发挥酶活性的条件，如温度， pH 和底物浓度等。酶活性的大小，是以特定的反应系统和条件下测到的反应速度来表示的。而反应速度可以底物的减少或产物的增加来表示。酶活性用单位（ μ ）表示。酶的单位可以这样定义：在一定条件下，一定时间内将一定量的底物转化为产物所需的酶量为一个单位。平时，我们在文献资料中还可以看到所谓酶的国际单位，它又是怎样规定的呢？1961年国际生化协会上规定：在一定条件下，1分钟内将1微克分子的底物转化为产物的酶量为一个国际单位（ I.U ），它的测定必须在 25°C ，在具有最适底物浓度、最适缓冲液离子强度和 pH 的系统内进行。但是，实际上往往采用各自规定的单位，给应用酶的企业带来不便。因为一种酶制剂活性的大小不能只看酶单位的多少，还要弄清楚是在什么条件下测到的。

2、酶活性测定的一般方法 利用酶制剂的食品加工工业中都需要掌握用酶量，因此，一般都要对市售酶制剂的酶活性进行测定。每一种酶制剂都有专门的测定方法，在这里只介绍一般的测定方法和需要注意的问题。

（1）一般的测定方法 酶活性的测定方法很多。常用的方法有分光光度法、测压法、电极法、旋光法、化学方法等。其中以化学方法和分光光度测定法用得最多，其优点是简便、迅速、准确和专一性强。

化学方法 将酶和底物反应一定时间后，中止反应，测定底物的减少或产物的增加，一般酶活性的测定多半测定产物的增加，因为底物都是过量的，少量底物的减少难以测准而产物从无到有比较灵敏。此外利用产物与其他试剂的颜色反应，也可与分光光度法结合起来测定酶活性。例如，

α -淀粉酶作用底物是淀粉，产物是糊精，可通过测定淀粉与碘呈蓝色反应到达消失点所需的时间，即一定量的淀粉被酶分解成与碘不起蓝色反应的糊精所需的时间，测定出 α -淀粉酶的活性。

分光光度测定法 如果反应的底物或产物含有双键或环状结构，它们在分光光度计的可见光波长区或紫外光波长区可显示不同的吸收光谱，从而根据其光谱的变化测定酶活性。如果反应的底物或产物不含有双键或环状结构，但可与含双键或环状结构的试剂反应形成化合物，同样可用此法测定。例如 葡萄糖异构酶的反应底物是葡萄糖 产物是果糖 使果糖与半胱氨酸吡唑试剂反应，其生成物在580纳米有最大吸收峰，因此可用分光光度法测定葡萄糖异构酶的酶活性。

无论哪种方法测定酶活性都是测量反应的初速度。所谓初速度，是指产物生成量与反应时间几乎成正比关系的酶反应速度。在测定任何一种酶活性的过程中，一般应先作进程曲线，即产物生成量与反应时间关系的曲线。如图1所示。

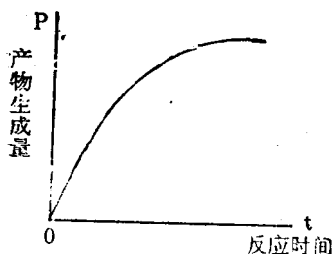


图1 酶反应进程曲线

曲线上任何一点的斜率就是相应时间的反应速度。曲线斜率在开始一段时间，产物生成量随反应时间成直线增加，但随时间的延长，曲线渐平坦，反应速度下降。其原因可能是底物浓度降低，产物浓度增加，加速了逆反应，或

产物有抑制作用等。为了求得反应的初速度，仅需测量反应过程中曲线的最初部分并绘出通过原点的切线。

(2) 影响酶活性测定准确性的因素 由上述可知测定酶活性要选用反应的初速度，而决定某酶促反应初速度的主要因素是酶的浓度，底物浓度，反应系统的 pH、温度和激活剂或抑制剂的存在。如果不弄清楚这些影响酶活性的因素就不能准确测定酶的活性。这也是测定酶活性中应注意的几个问题。

温度 每一种酶在一定条件下，只有在某一个温度下表现最大活性，即所谓最适温度。但它也会受其他条件如底物作用时间和 pH 值等的影响而改变。当其他的规定条件不变时，温度改变 1°C ，反应速度可相差 10% 以上。所以，反应必须在恒温槽内进行，并且所有试剂应该在反应开始前就达到需要的温度。

② pH 酶的活性与作用底物的氢离子浓度有很大关系。不同的酶都有不同的最适 pH 和所需要的缓冲液（见表 2）。同一种酶在不同 pH 时测定的活性不同。只有在某种缓冲液和某种 pH 范围内才表现出最大活性，即所谓最适 pH。一般认为酶分子处在最适 pH 时，其活性基团的解离状态最易与底物结合，而处在其他 pH 时，改变了活性基团的解离状态，酶和底物结合减弱，活性就降低。pH 对酶稳定性影响很大，在最适 pH 的一侧或两侧都可能导致酶的不可逆破坏。

酶浓度 在一定条件下，假定底物浓度为饱和量时，反应速度与酶浓度成正比（见图 2）。这时，反应速度与底物浓度无关，即零级反应。

表 2

不同蛋白酶的缓冲液和 pH

蛋白酶名称	缓冲液	摩尔浓度 (M)	pH
1.398	磷酸缓冲液	0.02	7.5
166	同上	0.02	7.2
3942	同上	0.02	7.2
3350	乳酸-乳酸钠	0.05	2.5
537	同上	0.05	3.0
209	硼砂-NaOH	0.05	10.0
289	同上	0.05	10.0
2709	同上	0.05	11.0

一般而言，测定活性用的酶尽可能纯化。但是，工业用的酶制剂难以达到高纯度。为避免由于微量杂酶存在而引起的反应，尽可能用低浓度的待测酶液。同时还要注意以下两点：第一、做好待测酶液的制备。如 α -淀粉酶，先精确称取酶粉 1.0000~2.0000 克，用少量 0.02M pH6.0 磷酸氢二钠柠檬酸缓冲液于 40°C 溶解，

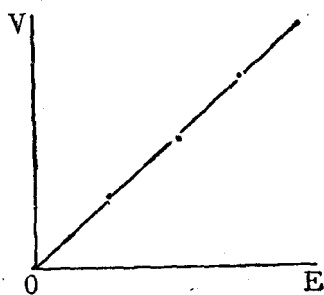


图2 反应速度和酶浓度成正比

用玻璃棒捣研；将上层液小心倾入容量瓶中，沉淀部分再加缓冲液反复捣研 3~4 次；最后全部移入容量瓶中，用缓冲液定至刻度，再用四层纱布过滤，其滤液供测定用。如果在制备过程中，没有充分将酶粒捣研开

或过滤不当都将造成误差。第二、当其他条件恒定以后，一定要控制好待测酶液的用量，见表3。

表 3 几种主要酶制剂的待测酶液用量

名 称	酶 用 量 控 制 范 围
α -淀粉酶	作用于2%可溶性淀粉20毫升的酶反应全部时间控制在2.0~2.5分钟之内
糖化酶	对照与样品消耗0.05N硫代硫酸钠的差数控制在3~6毫升。
蛋白酶	OD值控制在0.2~0.4范围
脂肪酶	样品与对照耗碱量的差数控制在1~2毫升
葡萄糖异构酶	OD值控制在0.2~0.6范围

底物浓度 在酶活性测定中，底物纯度和浓度是十分重要的因素。要求底物尽可能纯化。如果底物具有旋光性，则应对两个异构体分别检验。因为某种酶可能只对一个异构体起作用，而另一个异构体的存在可能抑制酶。所以，在测定中往往对底物来源作严格规定，见表4。

底物浓度是决定酶反应速度的因素。在低的底物浓度时，底物浓度增加，反应速度随着增加，反应速度与底物浓度成正比。当底物浓度增高时，增加底物浓度，反应速度虽随之增加，但它不再与底物浓度成正比。当底物浓度增加到一定程度以后，反应速度不受底物浓度的影响而趋于恒定，达到了测定酶活性时底物要过量的要求。

表 4 几种主要酶制剂测定的底物来源

名 称	底 物 来 源
α -淀粉酶	浙江菱湖淀粉厂出品化学纯可溶性淀粉
糖化酶	同 上
蛋白酶	上海乳品一厂出品化学纯酪素
脂肪酶	聚乙烯醇 (P.V.A), 分子量 3 500, 聚合度 1 000~1 500, 上海东方红造漆厂出品。 橄榄油, 上海试剂总厂第二分厂出品。

⑤抑制剂 凡能降低酶的活性甚至使酶完全失活的物质称为酶的抑制剂。测定酶活性时应尽量避免抑制剂的存在。抑制剂可分两类：一类为不可逆抑制剂。这类抑制剂与酶的结合是不可逆的化学反应，用透析方法不能除去，酶活性也不能恢复。二类为可逆抑制剂。这类抑制剂与酶的结合是可逆的，能用透析除去，酶活性即可恢复。

影响酶活性较大的抑制剂主要有以下几种：

a. 重金属离子，如汞、铅、铜、银等。因为它们均是蛋白质的沉淀剂，所以，一般在高浓度下致使大多数酶失活。为了避免重金属离子对测定的影响，可添加金属螯合剂乙二胺四乙酸盐消除重金属离子的抑制。

b. 一些氰化物和硫化氢。它们容易与金属离子形成稳定的络合物，因此对含铁离子、铜离子的酶具有抑制作用。

c. 一些烷化剂、形成硫醇键的试剂和氧化巯基的试剂均能与巯基反应，而巯基是许多酶分子表现催化功能的必需基团，若巯基发生了反应，则酶将受到抑制。

(四) 食品酶制剂分类和命名

1. 食品酶制剂的分类 目前食品酶制剂按它加工食品原料的作用物可粗分为以下五类。

(1) 糖类分解酶 (Carbohydrases) 分解淀粉、糊精、双糖、单糖以及果胶、纤维素等的一类酶。例如, α -淀粉酶、 β -淀粉酶、异淀粉酶、糖化酶、茁霉多糖酶、乳糖酶、蜜二糖酶、纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、转化酶、柚苷酶、橙皮苷酶等。

(2) 蛋白质分解酶 (Proteolytic enzyme) 分解蛋白质的酶。例如, 木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶、细菌蛋白酶、霉菌蛋白酶、凝乳酶等。

(3) 脂肪分解酶 (lipases) 分解不溶性脂肪和脂肪酸脂的一类酶。例如, 胰脏脂肪酶、牛乳脂肪酶、植物脂肪酶、霉菌脂肪酶等。

(4) 氧化还原酶 (oxidoreductases) 指催化氧化或还原的一类酶。例如, 葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶、聚酚氧化酶、脂氧化酶等。

(5) 其他酶类 例如, 用于DL-氨基酸拆分的氨基酸酰化酶, 催化葡萄糖异构化生成果糖的葡萄糖异构酶, 以及环状糊精葡萄糖基转移酶等。

以上五类食品酶的来源和用途, 见表5。

2 酶的命名 用于食品加工的酶制剂的命名有两种: 习惯命名法和系统命名法。

(1) 习惯命名法是根据酶的来源、催化的底物和催化

反应性质进行命名的。这是工业上常用的命名法。例如，按酶的来源命名的胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、胰蛋白酶等，按酶作用的底物命名的淀粉酶、果胶酶、纤维素酶等。按酶所催化的反应性质命名的变位酶、脱氢酶等。

此外，有的酶催化同一类底物但来源有几种，为了区别，往往在以底物命名的酶名称前面加上来源名称。例如，细菌 α -淀粉酶和真菌 α -淀粉酶，说明了前者酶来源于细菌，后者来源于真菌。有的酶催化同一类底物但其作用所处的环境pH不同，为了区别，往往还加上环境pH的名称。例如，碱性蛋白质、中性蛋白酶、和酸性蛋白酶。

(2) 系统命名法是国际酶学委员会1961年提出的。规定，每一种酶都有一个习惯名称和一个系统名称。习惯名称简单、实用；系统名称标明酶的底物和反应性质，若底物有两个，则两个底物名称以“：”号分开。例如，习惯名称葡萄糖氧化酶，其系统名称为 β -D-葡萄糖 :O₂氧化还原酶。

表 5 在食品加工中较重要的酶

酶名称	来 源	用 途
糖类分解酶		
α -淀粉酶	枯草杆菌、地衣芽孢杆菌、米曲霉、黑曲霉、麦芽	制造糊精、饴糖、高麦芽糖、葡萄糖、果葡糖浆、酿酒、酒精，果汁加工中分解果汁中的淀粉，改善面包质地

β -淀粉酶	大麦芽、麸皮、巨大芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌	制造麦芽糖、蒸饼防老化
异淀粉酶	假单胞杆菌	同 β -淀粉酶合用制造麦芽糖
茁霉多糖酶	克氏气杆菌	制造直链淀粉等
糖化酶	黑曲霉、根霉、红曲霉	制造葡萄糖、用作酿酒和酒精工业的糖化剂、生产为发酵工业用的可发酵性糖
乳糖酶	脆壁酵母、克氏酵母、黑曲霉	生产低乳糖牛奶，防止冰激淋乳糖结晶
蜜二糖酶	紫红被包霉	分解棉子糖，提高甜菜糖得率
果胶酶	黑曲霉、木质壳霉、米曲霉	果汁澄清、果实榨汁、葡萄酒澄清
转化酶	啤酒酵母、假丝酵母	从蔗糖生产转化糖、防止糖果发砂
菊粉酶	曲霉	水解菊粉制造果糖
柚柑酶	黑曲霉	除去桔汁苦味
橙皮苷酶	黑曲霉	防止柑桔罐头的白色混浊、制造橙皮苷
花青素酶	黑曲霉	桃子、葡萄脱色

纤维素酶和半纤维素酶	绿色木霉、黑曲霉	谷类、蔬菜、果实加工，植物成分提取辅助剂，速食食品生产，与果胶酶合用提高果汁澄清
蛋白质分解酶		
木瓜蛋白酶	木瓜	防止啤酒混浊
无花果蛋白酶	无花果	肉类嫩化
菠萝蛋白酶	菠萝	同上
细菌（中性）蛋白酶	枯草杆菌	制造脱腥豆乳、水解蛋白、改善苏打饼和酥饼质量
酸性蛋白酶	黑曲霉	啤酒澄清，面包和糕点的质量改进
霉菌蛋白酶	米曲霉、栖土曲霉、酱油曲霉	水解蛋白，调味品制造，防止酒类混浊
凝乳酶	犊牛或羔羊的皱胃，粟疫菌、微小毛霉	制造干酪
脂肪分解酶		
胰脏脂肪酶	胰脏	干酪和奶油生香、制造冰淇淋、巧克力
霉菌脂肪酶	黑曲霉	同上

氧.化还原酶		
葡萄糖氧化酶	青霉、黑曲霉	食品加工（除去氧和葡萄糖以改进品质或防腐）
过氧化氢酶	曲霉、青霉	食品加工中分解 H_2O_2
脂肪氧化酶	紫花苜蓿、大豆、马铃薯	食品加工中作某些食品的漂白剂
其他酶类		
氨基酸酰化酶	霉菌、细菌	DL-氨基酸拆分
葡萄糖异构酶	链霉菌、凝结芽孢杆菌、游动放线菌	制造果葡糖浆
环状糊精葡萄糖基转移酶	嗜碱性芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌	制造环状糊精、偶联糖
延胡索酸酶	短杆乳酸菌	由延胡索酸制造苹果酸
天门冬氨酸酶	假单胞杆菌、大肠杆菌	由延胡索酸制造天门冬氨酸

（五）固定化酶

在食品加工中应用的酶制剂，以往都是水溶性的，只能

使用一次，而且不易与产物分离。自60年代以来，随着酶制剂技术的发展，逐渐发展了固定化酶、固定化含酶的休止细胞和固定化增殖细胞，我们把这些统称为固定化生物催化剂。

所谓固定化，就是把水溶性的酶或含酶的休止细胞或增殖细胞，用物理的、化学的方法加以处理使之变成水不溶的酶、固定的休止细胞和固定的增殖细胞。采用固定化酶和固定细胞的优点是：（1）效率高，专一性强；（2）可以反复使用多次；（3）容易与产物分离，有利于精制、提高产品质量；（4）具有一定的机械强度，可以置于专门的反应器里进行连续的催化反应，便于连续化和自动化的操作；（5）一般固定化酶较游离酶热稳定性好，因此可利用温度的提高来加速反应的速率。

1、固定化酶的性质 自然状态的酶是可溶于水的 经固定化后变成不溶于水的酶，随之许多酶学性质也发生了改变。如酶对温度和变性剂的稳定性，反应速度，一般都较自然酶高，致使酶的效率成倍，甚至十几倍的提高。

（1）稳定性 酶的稳定性系指酶对温度、化学试剂和蛋白酶作用的稳定程度。自然酶固定化后，酶分子直接固定在载体上而引起酶蛋白质分子构型的改变，见图3。在许多情形中，由于固定化后酶蛋白质结构的稳定，阻碍了酶的自溶或变性剂的作用，使得固定化酶的稳定性增加了。

热稳定性 用二醋酸纤维素作为载体制备的固定化葡萄糖异构酶，它能够将葡萄糖异构为果糖，生产果葡糖浆。经固定化后酶的热稳定性较游离酶好，见图4。而同一种酶因选用的载体和固定化方法不同则热稳定性也不同，如表