

GMP、SSOP。我国 GMP 主要应用于制药工业, 食品企业只有保健食品和膨化食品企业执行我国以国际形式制订的 GMP, 这是远远不够的, 还应制定出其它食品的良好操作规范, 并使我国食品安全法规尽快与国际接轨。我国食品企业种类很多, 不可能全面实施 HACCP 管理, 应首先从容易引起安全问题的大宗食品入手, 如水产品、果汁、肉制品、奶制品、蛋品等的 GMP、SSOP, 从而建立相应的 HACCP 体系, 并逐渐在食品企业推行。首先要求从大型食品企业做起, 中型食品企业和小型食品企业分批、分阶段逐步实施 HACCP 管理。现在我国有许多食品企业已经通过了 ISO9000 质量认证, 该质量认证体系基本包括了 HACCP 所要求的从食品加工原料、食品加工过程到产品的贮运、销售等环节标准化实施规程, 可以帮助验证, 实施 HACCP 程序, 为建立 HACCP 打下了良好的基础。

再者, 必须加大科研投入, 开展相关的研究工作, 建立 HACCP 研究组, 主要研究食品中有害物质的检测技术(如二恶英、兽药、农药和动物疾病等方面的检测技术)、食品污染的检测控制技术(如食品污染物和致病微生物的检测控制)、食品安全控制技术等, 从而使我国食品检测技术、食源性疾病预防与控制技术等达到国际水平。同时, 还要开展不同食品生产、加工、贮藏、运输、销售等环节的危害关键点分析与控制技术, 从而保证 HACCP 体系在企业

中的有效实施。

参考文献

- 1 黄福南. 危害分析关键控制点(HACCP), 食品与发酵工业, 2002, 28(2): 75~78.
- 2 汤天曙等. 我国食品安全现状和对策. 食品工业科技, 2002, (2): 4~8.
- 3 曾庆孝等. 食品安全性与 HACCP. 中外食品工业信息, 2000, (4): 11~12.
- 4 周树南. 食品生产卫生规范与质量保证. 中国标准出版社, 1997.
- 5 刘秀梅. 食品安全性问题及其控制. 21 世纪人类食品面临的新问题学术论文集(北京市食品学会), 2001, 9: 17~21.
- 6 林勇毅. 认识 HACCP 法规. 中国食品报, 2002, 2: 8.
- 7 Spether, W. H.. The modern HACCP System. Food Technology, 1991, 45(6): 116~120.
- 8 The Use of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) Principles in Food Control. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995.
- 9 HACCP Introducing the Hazard Analysis Critical Control Point System. Food Safety Issues, World Health Organization, WHO/FSF/FOS/97, 2.

甜蛋白的特性及其生物法生产

洪薇 曹家树 浙江大学园艺系 杭州 310029

刘小杰 浙江大学食品科学系 杭州 310029

Ts202 A

摘要 甜蛋白是一类新兴的、有巨大开发潜力的甜味剂, 它具有低能量、不会引起龋齿等特性。本文综述了六种甜蛋白和一种甜味调节剂的生化特性, 并对它们的应用现状和开发前景进行了论述。

关键词 甜蛋白 甜味剂 食品工业 基因工程

Abstract Sweet-tasting protein is a kind of sweetener with intensive potential. There is an increasing demand for it because of the characteristic of low-calorie. It also does not contribute to tooth decay. Six kinds of sweet-tasting proteins and a sweet tasting-modifier were reviewed in this article. The application foreground was also remarked.

Key words Sweet-tasting protein Tasting-modifier Food industry Gene-engineering

过去应用在食品、饲料和其他产品中的甜味剂主要是一些低分子量的化合物, 如蔗糖等。近年来, 人们对低能量甜味剂的需求量越来越大, 同时, 人们也要求食品更加健康、天然。为了满足这种需要, 科学家和一些公司正在积极寻求新的甜味剂。这些甜味剂与蔗糖相比, 具有很高的甜度, 且达到相同的甜度, 使用量很少, 这就可以忽略其热量摄入; 它们一般不会引起龋齿, 不会引发病人的胰岛素反应, 也可用在糖尿病患者的食品中; 有些高甜度甜味剂还具有增味作用, 因此它们的使用范围变得更广泛。

目前, 有六种高甜度甜味剂得到了欧盟管理组织的许可, 可以用于食品中, 它们是: 阿斯巴甜、糖精、环己氨磺酸盐、新橙

皮苷 DC、丁磺氨-K 和奇(异果)甜蛋白。前五种是低分子量的化合物, 通过传统的有机合成法制得, 而奇甜蛋白是一种天然蛋白质。甜蛋白主要存在于热带植物的果实中, 当地人经常将作为甜味剂使用。直到近 30 年来, 才对这些甜蛋白进行了商业性开发。随着奇甜蛋白作为甜味剂和增味剂商业开发的成功, 人们对这类蛋白产生了浓厚的兴趣。近年来, 人们发现、研究、纯化了许多甜蛋白, 并对其性质进行了研究, 对部分甜蛋白的基因进行了克隆和测序, 有些已经在外源宿主中得到表达。常见的甜蛋白有六种: 奇甜蛋白(Thaumatococcus)、应乐果甜蛋白(Monellin)、马槟榔甜蛋白(Mabinlin)、仙茅甜蛋白(Curculin)、Pentadin 和 Brazzein, 此外, 非洲奇果蛋白(Miraculin)本身虽不

是甜蛋白,但它是一种重要的调味剂。在这些甜蛋白中,只有奇甜蛋白实现了商业化,而其它六种正在紧张的研发中,相信不久,它们中的一些也会实现商业化。

1 甜蛋白的种类及特性

1.1 奇甜蛋白

奇甜蛋白是一类极甜的蛋白,主要存在于热带植物 *Thaumatococcus daniellii* Beanch 的果实内。150 年前, Daniell 首次描述了这一植物,它主要分布于西非利昂山脉到扎伊尔的雨林地带。van der Wel 和 Loeve 于 1972 年第一次从中分离出该甜蛋白。因其有强烈的甜味(是蔗糖甜度的 3000 倍),人们认为奇甜蛋白是最有潜力的蔗糖替代物。目前,从该植物的果实中提取出了奇甜蛋白,已通过了毒理学和安全鉴定。许多管理机构许可在食品和饲料生产中用作甜味剂和芳香增强剂。由于从自然资源中得到奇甜蛋白比较困难,因此人们尝试在非自然环境下培养 *T. daniellii* Benth, 在这些培养条件下(包括温室),该植物能够生长,但不结实。

所有的奇甜蛋白都含有 207 个氨基酸,主要分为奇甜蛋白 I 和奇甜蛋白 II,二者只在 5 个氨基酸序列上存在差异。奇甜蛋白 II 的基因已被克隆并测序^[1]。科学家正试图在微生物和转基因植物中表达奇甜蛋白^[2]。有人认为,利用重组微生物来生产奇甜蛋白要想取得成功,则每升发酵液中至少能提取出 1g 该蛋白,但迄今为止,还未能达到该表达水平。人们也在转基因植物表达奇甜蛋白方面做过许多工作。Witty 利用转基因 *Solanum tuberosum* 得到了具有甜味的重组奇甜蛋白。利用非热带的转基因植物来提取奇甜蛋白,可以替代 *T. daniellii* Benth. 的果实中提取奇甜蛋白。

奇甜蛋白具有持久的回味,但人们的味觉难以接受。为了避免这个问题,对奇甜蛋白 I 基因进行了定点诱变,得到了奇甜蛋白 I 类似物^[3],其中一些回味较弱,可以满足市场对奇甜蛋白质量的要求。

1.2 应乐果甜蛋白

应乐果甜蛋白存在于西非的一种植物 *Dioscoreophyllum cumminsii* Dielsde 的红色浆果中。Morris 等于 1972 首次纯化了这种蛋白质,其甜度大约是蔗糖的 3000 倍。不同于单链的奇甜蛋白,它包含两条分别由 45 和 50 个氨基酸残基组成的多肽,它们通过非共价作用互相结合在一起。现在人们正试图用微生物和转基因植物来表达应乐果甜蛋白。

应乐果甜蛋白在酸性条件下加热到 50℃ 将会失去甜味。为了保持其稳定性, Kim 等^[4] 对应乐果甜蛋白的结构进行了改造,将两条多肽链通过不同的连接形成一系列单链类似物,这些单链类似物中的一条已在大肠杆菌中表达,与天然的应乐果甜蛋白类似,在极端的 pH 和温度条件下更稳定,是一种有潜力的甜味剂。现已用转基因植物表达应乐果蛋白,但表达水平还很低^[5]。目前,也试图以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和产阮假丝酵母 (*Candida utilis*) 来表达应乐果甜蛋白^[6]。

1.3 马槟榔甜蛋白

中国植物 *Capparis masakai* Levl 果实中有一种甜蛋白,由

Liu 等^[7]首次描述。现认为在植物 *C. masakai* Levl 中至少存在有四种有甜味的多肽。其中研究最多的是马槟榔甜蛋白 II,它由两条多肽链组成,分别含 33 和 72 个氨基酸残基,通过非共价作用紧紧结合在一起。它的甜度大约是蔗糖的 100 倍。

其他种类的马槟榔蛋白也被分离出来^[8],分别被命名为马槟榔甜蛋白 I-1、III 和 IV。其热稳定性与其他有甜蛋白截然不同,由某单个氨基酸所决定。例如,当马槟榔甜蛋白链的 β 第 47 位是精氨酸时,此蛋白表现出热稳定性;而当 β 链的第 47 位是谷氨酸时,呈热不稳定性^[9]。

编码四种马槟榔甜蛋白 (I-1、II、III、IV) 基因的 cDNA 已被克隆并测序^[9]。马槟榔甜蛋白 IV 可由马槟榔甜蛋白 III 剪切而得,因为 IV 型短链的 C-末端比 III 型要短(差 4 个氨基酸)。测序分析表明马槟榔甜蛋白 II 在刚合成时是一条单链,其中两条多肽由 14 个氨基酸相连接,该连接物在蛋白质成熟过程中被切除。有人尝试用转基因马铃薯的块茎表达马槟榔甜蛋白 II^[10],但还未见明确报道。

1.4 Pentadin

Pentadiplandra brazzeana Baillon 是一种攀缘灌木,分布在热带的许多非洲国家。van der Wel et al (1989) 首次从它的果实分离到分子量为 1.2×10^4 道尔顿的甜蛋白。电泳研究表明,成熟蛋白的亚单位通过二硫键连接。它的甜度是蔗糖的 500 倍,与奇甜蛋白相比,它的甜味更接近于马槟榔甜蛋白。到目前为止,还未对这些甜蛋白的特性作进一步的研究。

1.5 Brazzein

Brazzein 也是在 *P. brazzeana* Baillon 的果实中发现的,由 Ming D 和 Hellekant G^[11]首次分离出。由于 Pentadin 还未测序,还没有证据判断 Brazzein 与 Pentadin 是否同源,或属于同一家族。Brazzein 的分子量为 6473,已经阐明了它的三维结构^[12]。同奇甜蛋白一样,Brazzein 是一种单链蛋白质(54 个氨基酸),它的甜味持久,甚至在 353K 下保温 4 个小时后,仍未见明显下降,这可能是由于它的分子中含有四个二硫键,结构比较稳定^[13]。

有人对 Brazzein 基因进行了测序^[11],并提出 Brazzein 可以在一些微生物如大肠杆菌 (*E. coli*) 和转基因植物中表达,但还未见详尽的研究结果。

1.6 仙茅甜蛋白

仙茅甜蛋白是从植物 *Curculigo latifolia* 分离出的,这种植物生长于马来西亚的部分地区^[14]。此蛋白含有 114 个氨基酸残基,估计其分子量为 12491,由相同的亚级通过二个二硫键连接构成的二聚体,其甜度是蔗糖的 550 倍。仙茅甜蛋白也是一个甜味调味剂,能将对酸味的感受(如柠檬)转化为甜味(如橘子)。目前其 cDNA 已经克隆并测序^[15],但目前还没有此蛋白在重组宿主细胞内表达的报道。

1.7 非洲奇果蛋白

西非灌木 *Richadella dulcifera* 的红浆果内含一种名为非洲奇果蛋白的甜味调节蛋白,由 Theerasilp 和 Kurihara 首次分离得到。它含有 191 个氨基酸残基,估计分子量为 24600。当地的非洲奇果蛋白可能是由一些二硫键连接而成的四聚体。非洲奇果蛋白自身不能产生甜味,但也像仙茅甜蛋白,可以将酸味反应

转化为甜味反应。

仙茅甜蛋白基因的 cDNA 已克隆并测序^[16]。编码仙茅甜蛋白的人工合成基因已插入大肠杆菌中表达^[17],已检测到了重组仙茅甜蛋白,但还未见详尽的报道。

2 甜蛋白的工业应用、现状与未来

甜蛋白作为传统甜味剂的替代品具有很大的吸引力,许多大学和国家研究所发现并研究了这些甜蛋白,许多公司也对甜蛋白的商业开发产生了浓厚的兴趣。天然奇甜蛋白是从植物 T. Danielli 的假种皮中提取的,在 1983 年英国管理机构首先许可其作为安全的食品添加剂。随后英国的 Tate & Lyle 公司和 Hays Ingredients 公司开始生产商品名为“Talin”的奇甜蛋白。奇甜蛋白广泛应用于动物饲料、宠物食品、口香糖中,它也可以作为药品的辅助物,在日本,奇甜蛋白广泛应用于许多消费品中。它的成功开发,促使人们寻求新的生产方法,如利用重组微生物和转基因植物来生产奇甜蛋白。虽然这些方法在实验室已经取得了很大的成功,但这些方法生产的奇甜蛋白还未投放市场,一些公司也在进行这方面的研究开发工作。由于应乐果甜蛋白在高温下不稳定,故它的商业开发进展很慢。日本的 Kirin 公司利用产脲假丝酵母(*C. utilis*)表达应乐果甜蛋白(10mg 应乐果甜蛋白/g 湿酵母),美国的 FDA 已经将产脲假丝酵母归为 GRAS,这些都加速了应乐果甜蛋白的商业化步伐。

美国的 Nektar Worldwide 公司利用玉米表达 brazzein,据公司的报道,从 1000Kg 玉米中可以提取 1Kg 的 brazzein。美国的 BioResources International 公司正在研发非洲奇果甜蛋白,他们采用传统的植物提取法和基因重组法来生产非洲奇果甜蛋白,许多公司利用转基因植物和大肠杆菌来表达仙茅甜蛋白。

甜蛋白要想实现商业化,必须克服技术、管理和市场方面的障碍。从技术方面考虑,任何蛋白质都可以通过两种方法获得,即从天然原料中提取,或利用基因重组技术获得。从天然原料中提取存在两个不足,一是建厂要受空间限制,厂房必须建在原料出产地;二是生产要受时间限制,难以满足市场的需要。利用基因重组技术生产甜蛋白,首先考虑的是这种甜蛋白的甜味性质要与来自天然的相同,重组表达的奇甜蛋白没有甜味,其原因还不清楚,可能是由于重组蛋白不恰当的折叠,或缺乏翻译后修饰及其它原因。如果重组蛋白具有甜味,那么通过这种方法生产甜蛋白就可以与提取法竞争。为了与传统的提取法相竞争,生物技术(重组技术)法必须要有一定的产率,比如奇甜蛋白,其最低产率应不小于 1g 分泌蛋白/L。尽管生物技术法生产甜蛋白非常有效,具有市场竞争力,但要投入生产,还必须获得有关权威机构的许可(如美国的 FDA),这就需要做相关的毒理学实验,并且还要对生物技术和传统提取法生产的甜蛋白做进一步的研究,看它们是否有差别。当生产技术可行,并获得许可,那么最终将由市场决定其是否成功。生物技术法生产的甜蛋白不仅要与天然的甜蛋白竞争,而且还要与其它甜味物质竞争,如蛇菊苷、干草皂苷等。蛇菊苷是从南非的一种植物(*Stevia rebaudiana*)叶子中提取的,其甜度是蔗糖的 300 倍,

并具有较好的稳定性和溶解度。目前十几个国家已经允许蛇菊苷作为食品添加剂,应用于软饮料、口香糖、糖浆及药物中。干草皂苷是从植物 *Glycyrrhiza glabra* 中提取的、无热量的甜味剂,尽管甘草味不利于它的广泛使用,但美国已经允许它在许多产品中应用。

近 10 年来,生产甜味剂有一个新的趋势,即将几种甜味剂和增味剂混合起来,这种混合甜味剂热量很低,能够提高食品的品质和味道。虽然将甜蛋白实现商业化还有许多障碍(不仅仅是技术方面的),但其它甜蛋白也会象奇甜蛋白一样,最终会作为商品走向市场。据估计,美国每年甜蛋白的市场营销额将会达到 1 亿美元。许多大公司正在加紧研究开发甜蛋白。这些都预示着甜蛋白作为传统甜味剂的替代品,将会有广阔的工业应用前景。

参考文献

- Edens L, Heslinga L, Klok R et al. Cloning of cDNA encoding the sweet tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* 1982, 18: 1-12.
- Witty M, Higginbotham JD. Molecular cloning and transgenic expression of the sweet protein mabinlin in potato tubers. *Plant Physiol*, 1994, 111: 57.
- Blair LC, Koduri RJ, Lee J H et al. DNA encoding [Lys⁴⁶, Asp⁹⁷, Asp¹¹³] and [Lys⁴⁶, Asp¹¹³, Asp¹³⁷] thaumatin I polypeptides. PCT Patent WO 90/05775.
- Kim S H, Kang CH, Kim R. et al. Redesigning a sweet protein: increased stability and renaturability. *Prot Eng*, 1989, 2: 571-575.
- Peñarrubia L, Nirasawa S, Nakaya K, et al. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Biotechnol*, 1992, 10: 561-564.
- Konodo K, Miura Y, Sone H, et al. High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 452-457.
- Liu X, Hu Z, Maeda S, et al. Purification, complete amino acid sequence and structure characterization of the heat stable sweet protein, mabinlin II. *Eur J Biochem*, 1993, 211: 281-287.
- Nirasawa S, Nishino T, Katahira M, et al. Structure of heat-stable and unstable homologues of the sweet protein mabinlin. *Eur J Biochem*, 1994, 223: 989-995.
- Sun S, Xiong L, Hu Z, et al. Recombinant sweet protein mabinlin. PCT Patent WO. 97/00945.
- Xiong L, Sun S. Molecular cloning and transgenic expression of the sweet protein mabinlin in potato tubers. *Plant Physiol*, 1996, 111: 57.
- Ming D, Hellekant G. Brazzein, a new high potency sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS Lett*, 1994, 355: 106-108.
- Calwell JE. Solution structure of the thermostable sweetening protein brazzein. *Nat Struct Biol*, 1998, (5-6): 427-431.
- Ishikawa K, Ota M, Ariyoshi Y, et al. Crystallization and preliminary

- nary X-ray analysis of brazzein, a new sweet protein. *Acta Crystallogr D*, 1996, 52: 577 ~ 578.
- 14 Yamashita H, Theerasilp A, Nakaya T, et al Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein with taste-modifying activity, curculin. *J Biol Chem*, 1990, 265: 15770 ~ 15775.
- 15 Abe K. Molecular cloning of curculin, a novel taste-modifying protein with a sweet taste. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1130: 232 ~ 234.
- 16 Masuda Y, Nirassawa S, Nakaya K, Kurihara Y. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein miraculin. *Gene*, 1995, 161: 175 ~ 177.
- 17 Kurihara Y. Sweet proteins in general. CRC. Boca Raton, 1998, 1 ~ 18.

真空与冷冻在生物工程下游技术中的应用

陶永清 天津商学院食品与生物工程系 300134

T3205 A

摘 要 本文就冷冻浓缩与真空冷冻升华干燥操作的理论基础及典型应用系统的设备组成进行了一些介绍, 阐述了针对生物制品冷冻浓缩与真空冷冻升华干燥系统的工艺过程及影响因素, 并针对生物制品的特性指出了其操作中的一些注意事项, 还详细讨论了生物制品冷冻升华干燥各阶段影响其操作时间和生产效率的若干因素, 最后阐述了冷冻浓缩与真空冷冻升华干燥对生物制品的适用性。

关键词 真空 冷冻 升华 浓缩 干燥 生物工程

Abstract This paper expounded the theoretical basis of freeze-concentration and vacuum sublimation-dry system, the components of system equipment, and the technical operating process on downdrift side of bioengineering products, the factors of operation during different processing stages and the characteristics of the bioproducts. Furthermore, it discussed about some factors affecting the operation time and productivity in the phase of bioproducts' freezing-sublimation-dry. Finally their adaptability was pointed out.

Key words Vacuum Freeze Sublimation Concentration Dry Bioengineering

对于生化产品尤其是某些基因工程产品由于很不稳定, 在遇热、遇极端 pH 或遇有机溶剂时常会引起失活或分解, 所以对于它们的下游加工技术便成为制约其生产效率或是产物得率的一个瓶颈, 而对于其最终产成品是固体制品的生物制品, 其浓缩和干燥方法的选取更是一个非常值得深入探讨的问题, 传统工业化生产中浓缩和干燥方法比较多, 比如升降膜式蒸发浓缩、刮板式薄膜浓缩、离心式薄膜浓缩, 以及红外线干燥、沸腾干燥、气流干燥、喷雾干燥和冷冻干燥等。一般来说, 传统的各种膜式浓缩尽管借助真空系统可以降低操作温度, 但毕竟也要使物料达到足够高的温度才可实现较好的浓缩操作。对于干燥操作来说, 采用红外线干燥虽然装置简单, 但温度较高; 气流干燥和沸腾干燥效率较高, 但物料所处温度也较高, 对热敏感的生物制品来说, 以喷雾干燥和冷冻干燥较适宜。喷雾干燥虽然操作温度也较高, 但物料干燥速度快, 物料受热时间很短, 所以对于多数一般性热敏性物料可以考虑采用, 然而冷冻浓缩和真空冷冻升华干燥则由于温度低, 不会使物料失活, 同时又是真空状态可大大降低氧化作用, 所以对于某些生物制品最为安全, 最为适合。本文对冷冻浓缩和冷冻升华干燥系统的原理及设备组成和工艺操作过程及其在生物工程中的应用等作了较详尽的介绍。

1 冷冻浓缩与真空冷冻升华干燥的理论基础

冷冻浓缩的基本原理是基于水与溶质在某一特定温度可以存在一共同晶点, 即冰与溶液两态平衡状态, 而真空冷冻升华干燥的基本原理则是基于水与溶质在某一特定温度可以存在一共同熔点, 即冰、液态、气态的三态平衡点。可见它们都是利用水的三态可以在一定条件下相互转换这一基本原理的。

具体来说冷冻浓缩就是利用冰与水溶液之间的固液相平衡原理, 将水以固态方式从溶液中去的一种浓缩方法。其流程如下。

原料液→冷冻→结晶→将冰与溶液分离→浓缩液

冷冻升华干燥则是在浓缩的基础上对浓缩液进一步除水的操作过程。浓缩后的原料液进一步降低温度便可得到以溶质为主要成分的固体物质, 此时物料中的水分为游离水和结合水两种, 结合水尽管数量多于游离水, 但因为结合水去除难度远远大于游离水, 所以通常两者所用时间基本相当。一般的干燥方法是将物料中的水分由液态在沸腾状态下转变为气态, 而冷冻升华干燥则是将物料中的水分先由液态冻结至冰点以下, 使水分转变为固态冰, 然后在较高的真空度下, 供给一定的热量, 将冰直接由固态气化, 也即升华为水蒸汽进入真空室, 随着升华的进行, 冰界面向冷冻层均匀地退却, 在其冰面退过的地方会产生多孔的干燥层。

升华干燥只能在低于水的三相点压力和低于物料冻结点温度下进行。除此之外还要维持升华干燥的不断进行, 还必须满