

以上是对工人农民强力可乐饮料研制的初步报告。待准备条件成熟后,再做人体实验。

参考文献

1. 山西医学院主编 劳动卫生与职业病学, 人民卫生出版社 1981
2. 武汉医学院主编 营养与食品卫生学, 人民卫生出版社 1981
3. 陈学存主编 应用营养学 人民卫生出版社 1984

4. 窦国祥编 饮食治疗指南 江苏科学出版社 1982
5. 胡珍珠等编著 家庭食疗手册 天津科技出版社 1982
6. 全国第四期饮料技术学习班 饮料生产技术资料
7. 陈仁惇 体力劳动的一些代谢变化及抗疲劳物质 生理科学进展12:47 1981
8. 刘耕陶 从分子生物学角度看一些“扶正培本”药物研究的进展 生理科学进展10:117 1979
9. 孔祥瑞编 必需微量元素的营养生理及临床意义 安徽科学技术出版社 1982
10. 黄梅丽等著 食品色香味化学 轻工业出版社 1984

动植物酶制剂的开发

广西亚热带作物研究所生化室 叶启麟 陈 强

一、动植物酶制剂生产应用概况

酶是一类生命体产生的具有催化功能的蛋白质,也称生物催化剂。由于酶促反应有高效、专一、温和的特性,已越来越受重视。

对于植物酶来说,主要利用的是蛋白水解酶。其中产量及用量最大的是木瓜蛋白酶(papain)。几乎整个热带地区都有它的生产和加工场所。它主要用于防止啤酒冷混浊和做肉类嫩化剂,也广泛用于水解蛋白,制药、分析化学和作为遗传工程的工具酶。法国近年即大量利用木瓜酶做鱼品加工,其中包括将杂碎鱼部分水解加工成禽、畜易于消化的饲料。

仅次于木瓜酶的有菠萝酶(Bromelain)。产地除美洲、非洲热带还有东南亚;利用范围与木瓜酶相仿。应指出由于上两种酶都是巯基酶,它们不似胰蛋白酶之类活性中心为丝氨酸羟基的蛋白酶那样,受许多豆科植物种子内含的胰蛋白酶等抑制物质抑制而降低活性。所以这两种酶在豆制品加工上越来越受到重视。^[3,5]

此外,较多应用的还有无花果蛋白酶(Ficin),基本用于肉类嫩化工业、据称,这是由于此酶对肌肉蛋白纤维的切点较为合适所决定的^[4]。

印度人早就会利用沙漠植物骆驼刺的蛋白

酶(Alhagain jewasee),他们在植物产地建立了简单的加工场和作坊、直接将骆驼刺的干制品用于皮革脱毛或软化工艺,成革质量据说比灰碱法的还要好。^[6]

非蛋白酶类的植物酶制剂在工业上应用较广的还有 β -淀粉酶,它主要存在于麦芽、甘薯、小麦、大豆等高等植物中、用于麦芽糖和糊精的制造。

世界主要酶类销售估算^[2](见表1)

动物酶的生产和应用更广泛,在欧美的大屠宰场或肉类加工厂内,大都设置有将动物的胰、胃、胆等脏器综合利用的车间,从这些脏器提取人们熟知的胰蛋白酶(Trypsin),胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin),胃蛋白酶(pepsin),凝乳酶(Renning)等大量用于食品、医药、轻纺工业的酶制剂。

许多国家从蛋清中分离提取溶菌酶作为安全的食品防腐、杀菌剂和消炎药。

蛇毒除了作为生物工程所必须的工具酶外,还主要用于制药。目前巴西、印度、泰国诸地生产的眼镜蛇、五步蛇之类的毒素大部分被运往欧美加工用于心血管疾病之类的良药。台湾省的蛇毒便相当程度占领了国际市场。

为了节省资金、能源、材料和便于连续生产、欧美国家更多地把昂贵的酶类固定于活化

表1

名	称	销售额(百万美金)	备 注
alkaline protease	硷性蛋白酶	80	微生物来源
glucose isomerase	葡萄糖异构酶	45	微生物来源
papain	木瓜蛋白酶	30	植物来源
latherbating		30	微生物来源
rennets	粗凝乳酶	30	动物和微生物
glucoamylase	淀粉葡萄糖化酶	25	
amylases	淀粉糖化酶	21	
pectinase	果胶酶	6	植物来源
blomelam	菠萝酶	3	微生物来源
all other	其他	20	植物来源
total		290	

的载体上,做成酶反应器柱。

诸如将木瓜酶接于固相载体处理啤酒,效果要比水溶性木瓜酶要好,^[7]并且不会改变啤酒的原有风味。〔法国专利 2091786(1972 年)〕。

二、动植物酶的生产及优越性

虽然目前生产性用酶大多还靠微生物体提取,微生物酶制剂的生产也有其独到之处。然而,动植物酶的制备比起微生物酶的生产仍有着不可低估的优越性。

它不需微生物酶生产时所用的繁多而大型的发酵设施,无需耽心发酵时杂菌污染甚至满罐作废;不似发酵微生物要消耗大量粮食。生产时排出的废料也远不如发酵时那么多,因而污染大大减少。最后它省去了很多象微生物酶制取时破除细胞壁所需的麻烦工序。

很多动植物酶制剂都可以是组织的直接干燥粉末。如剑麻酶可由干燥剑麻植物叶表栅栏组织制成产品。^[8]这样的粗制品即可用于皮革工业。骆驼刺酶用于柔革的制品亦与此相似。蜗牛酶也仅需把蜗牛的消化道冻干成粉就获得了有相当活性的工业酶制剂。轻纺、制革、甚至食品工业所用的动植物蛋白酶也往往只需直接干燥动植物组织并粉碎即成。不仅是因为这些行业对酶的纯度要求不高,而更重要的是这样制成的产品多含天然保护物质、且加工程序不多,活性保存较好。众所周知,酶制剂往往是越纯净、其活性降低就越迅速。

将酶进一步纯化、步骤也并不复杂。它的制法通常与蛋白质溶液的提纯一样。

一般可采取如下方法和步骤: 1. 盐析、分级盐析; 2. 有机溶剂沉降, 有机溶剂分级; 3. 等电点沉降; 4. 吸附分离; 5. 透析提取; 6. 柱层析分离; 7. 结晶法提纯分离; 8. 或者是这些方法的混用。

上述的方法步骤中,以分级盐析和有机溶剂分级分离提纯最为常用。这两种方法都是根据不同的蛋白质在不同浓度的中性盐溶液和不同浓度的各种有机溶剂中溶解度不同而达到分离目的的。例如血浆中的蛋白质(它们大多是酶)在低盐浓度时所有的蛋白质都是溶解的,但是中性盐硫酸铵为20%饱和度时,纤维蛋白析出; 23~28%时优球蛋白析出; 33~50%时拟球蛋白析出; 50%以上白蛋白析出。对于有机溶剂的不同浓度,酶蛋白就更敏感了。

盐析工艺过程可归纳如下:

组织匀浆→稀盐溶液溶出蛋白→离心去除沉淀杂物→上清液再加入一定量中性盐→离心去除沉淀杂蛋白→加入一定量同种中性盐→离心去除上清杂蛋白→将沉淀酶蛋白干燥→封装得制剂。

有机溶剂分级沉降程序基本与盐析同,只需将盐溶液转换成有机溶剂在冷冻条件下制备,且要增加一个使产品与有机溶剂分离并回收有机溶剂的步骤。

上面举的均是胞外酶的提取,而细胞内酶

则要经过破除细胞壁一步。当然细胞内酶的含量往往较少,提取也较难因而也较少用于工业提取。

三、提取酶的原则

〈一〉、筛选好的品种及其组织

在动植物酶提取时、首先要注意筛选高活力、高含量的动植物品种和组织部分,并选择在高含量的生育阶段来提取。植物酶还要考虑气象条件。

例如,在提取无花果酶和木瓜酶时首先要选择高活性含量的品种。无花果中有些品种就可能没有蛋白酶。木瓜和剑麻、菠萝的酶均取自皮汁、木瓜酶只有在未成熟的绿果才含有。剑麻酶的含量与植株生长状况极有关系,唯生长旺盛的麻株酶活性高。低产麻与高产麻的酶活性相差之数可高达10倍。

动物酶的提取则主要是含酶组织局限很大。比如胰、糜蛋白酶仅存在动物胰脏、只能从胰腺提取它们。胃蛋白酶仅在动物胃脏存在,自然也只能从胃部提取胃蛋白。

〈二〉、掌握酶的性质

要考虑酶的蛋白质特性,避免接触蛋白质变性因素。

譬如提取和生产时应避免接触强酸、强碱、高温、重金属离子,表面活性剂之类。它们都能使酶蛋白变性,或改变酶蛋白的结构而令酶失活。

〈三〉、避免破坏酶的活性中心

酶虽然是一种蛋白质但又与一般蛋白质不同。首先,在一级结构上可能相距甚远,甚至位于不同肽链上的几个氨基酸,由于肽链的盘曲折叠而在空间构象上相近。它们的活性巯基、羟基、咪唑基之类作用形成所谓的电子传递链。其次,这一部位还可能含有金属或接有辅酶、辅基,正是这一部位起到了与反应底物结合并催化底物反应的功能,如果它们的组成或空间构象被破坏就令酶的生物学活性完全丧失。故凡不利酶构象和活性部位结构的因素都必须避免接触。如剑麻酶、木瓜酶、无花果酶、

菠萝酶活性中心的巯基(SH基),就极易被氧化剂氧化形成二硫键或与重金属结合令酶失活。胰、胃蛋白酶活性中心的羟基(-OH)却容易为二异丙基氟磷酸之类破坏。金属酶易为柠檬酸、乙二氨四乙酸(EDTA)等金属整合剂整合失活。在生产过程中,这些因素就必须慎重考虑。

四、国内动植物酶制剂生产的原料现状和展望。

在我国、微生物、动物、植物,三方面的酶源中的后两项一直未能受到应有的重视,我国多年来出版的工业酶制剂教科书中就极少提及动、植物酶。

我国幅员辽阔、生态环境复杂、动植物酶的资源十分丰富。南方诸省数以百万亩计的菠萝、剑麻、蕃木瓜便是富含蛋白酶的植物。菠萝取去果肉做成罐头后,其皮汁尚能进一步处理成果汁和菠萝酶。可是,能这样综合利用的全国也仅有南宁罐头厂等极少数厂家而已。用于制酶的菠萝基地不到5%,全国菠萝酶的年产量还不足两吨。木瓜酶也有同样现象、产量之少远不足需。按85年统计,全国仅有我们、江门、广州河南园艺场、广州建筑研究所等五家作坊生产,总产不足3吨而按75计划广西生物工程专业组预算、单啤酒一项用酶量即达50吨/年,我国木瓜、菠萝两种酶年产之和,尚未达需求量的百分之十。至于说到剑麻酶这一丰富酶源的情况,更是令人遗憾。南方诸省拥有麻园30万亩,以中等麻田分析每ml麻皮汁含酶10000单位(酪蛋白法)^[9],每亩地可提酶3000万万单位,比菠萝含酶活性要高得多^[10],却根本没有得到利用,使大量可制酶的原料却在纤维加工过程中随污水排出,反而成了公害,以上提到的木瓜、剑麻、菠萝等是提取酶制剂加工工艺已是成熟的几种植物。对于其它千万种植物,能用之制取酶的肯定不少。我们完全可以提取出催化反应专一性各异切割位置不同的酶制剂以满足需要。从最局限的角度考虑,都将能提取出繁多的酶试剂产品、填补我国的空白。

我国的动物脏器酶生产原料，命运也好不了多少。每年宰杀的猪、牛羊牲畜何止亿万，它们的胰、胃均可加工成治疗蛇伤坏疽，烧伤的灵药胰蛋白酶、胃酶，白内障药物糜蛋白酶，治疗心脏病高血脂的弹性蛋白酶、激肽酶。而且这些酶也多是食品、纺织工业的重要酶类。可在我国，真正能将资源利用起来的也仅有武汉，上海等少数厂家。

蜗牛的消化道内确含有高活性的纤维素酶^[4]。蜗牛肉尽可出口，其消化道干粉则能用来处理杂草，将不能消化的纤维素部分水解而变为营养物质。故以其小而言，可为轻纺工业用酶、大则可用于整个饲料处理，解决禽畜喂养的碳水化合物来源以减少大量粮食消耗现状。可是在我国，蜗牛酶却只能在一些研究单位制成为数极少的工具酶。

南方诸省受南太平洋季风影响，终年湿度较高，蜗牛品种很多，在广西北海市就有蜗牛肉加工基地。在此罐头加工的废料中亦可变废为宝，提取出大量的纤维素酶。可以预料，在南海、北部湾广阔的热带海域中，蚌、蛤之类以水草为食物的软体动物消化道内将可找出切点各异，用途广泛的纤维素酶。将其利用则是一大笔财富。

我国鸡、鸭、鹅、鸽等家禽数量大、其蛋量亦大。按我国国情尽可不采用价格高昂的蛋清做原料，而是利用蛋壳制取溶菌酶^[11]，做抑菌、抗菌剂或生物工程破除细胞壁的工具酶。这一酶源在我国南方甚至完全未被开发。

至于酶反应器，我国也是较落后的。据了解国内还没有那一家工厂应用此技术。我们完全可以象国外厂家那样把价格并不低廉的木瓜酶、菠萝酶、胰蛋白酶等接在活化的载体上（比如接在琼脂糖凝胶、羟甲基纤维素等上），做成所谓酶反应器柱，让啤酒流水线通过反应器柱获得澄清质优产品，令豆浆通过反应器柱取得水解蛋白。

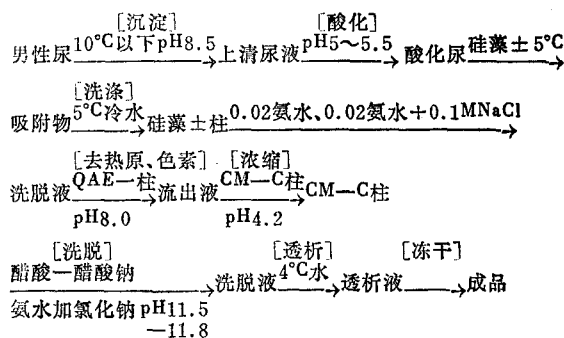
众所周知，尿激酶在体内可活化血纤溶酶原成为血纤维溶酶。它对血纤维蛋白、血纤维蛋白原、抗凝血因子V、VII、VIII、IV都有溶解

作用，因此可溶血栓、抗凝血，所以是一种十分有效的溶血栓药剂。动物实验证明它尚有明显的降低血压效应。在国外早已用于中风、各种栓塞、脏器移植、风湿，并用于肿瘤的协同治疗。因其无毒副作用所以是很好的药物。它主要存在于哺乳动物的尿中。人尿平均每毫升含5—6国际单位，只要对公共厕所做到适当的控制，这一资源简直无穷无尽。

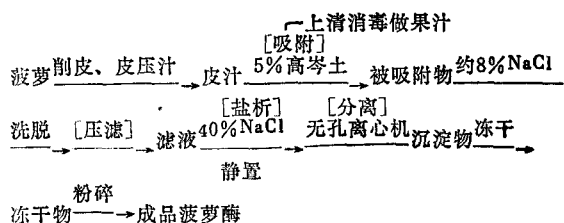
五、动植物酶制剂生产工艺举例

动植物酶制剂生产方法很多，现将几种酶的生产工艺介绍如下供参考：

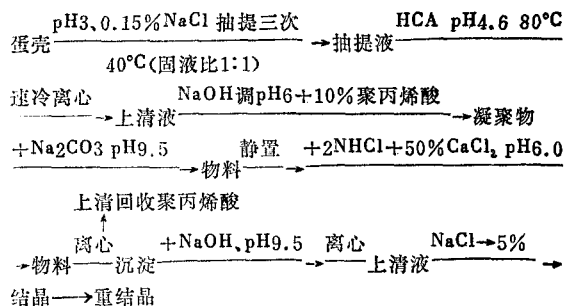
1. 尿激酶生产工艺：



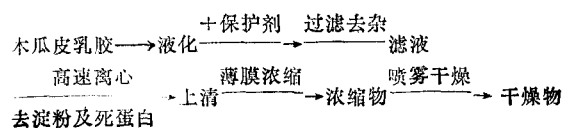
2. 菠萝酶工艺：



3. 溶菌酶生产工艺：



4. 木瓜酶工艺：



六、酶筛选和提取的几个易行方法举例

(一)、蛋白酶筛选的简易法

我们在筛选蛋白酶时基于蛋白酶对明胶的水解作用,利用废X光胶片的明胶底膜作反应底物。由于只需20个福林单位的低活性蛋白水解活性即可在附有黑色的银粒的胶片上腐蚀出白色空斑(因水解掉明胶片基而附于其上的黑色银粒子随之脱落)。我们将怀疑含有蛋白酶的各个科属的植物汁液滴加于其上而找出了含酶活性较高的龙舌兰科植物,并选出了含较高活性的无花果酶的植物品种。^{[14][12]}

(二)纤维素酶筛选

利用不含杂质的定性滤纸做底物。基于纤维素酶的水解溶化特性,将各种软体动物的消化道榨出液,浸泡这些纸头观察水解斑或溶解程度大小,根据消化道液的用量亦可筛选出较高活性的纤维素酶。

这样的例子当然还可以举一反三。

(三)、利用亲和层析提取纯酶制剂

将动植物浆用稀盐溶液浸泡溶解出含酶液后,离心去除沉淀的杂物。这时可采用亲和层析一步提出纯酶。该法是用抗体与抗原、抑制物与酶、底物与酶的亲和配对结合能力。将这些与酶亲和的配基连接在固相载体上做成层析柱,让含酶液通过其上而吸附、最后用适当的溶液洗脱柱上的酶就得到了很纯的酶蛋白。该法因为提取率高而纯、且分离柱一般都可多次反复使用,所以已成为国外工业性酶生产的常规方法。比如用甘氨酸、酪氨酸、精氨酸、(BZ 1)做配基的层析柱,用水做洗脱剂就能分

离出木瓜酶的纯品,用壳质底物做配基接于载体上用0.25MKCl 磷酸缓冲液($\text{PH}_{4.6}$)做洗脱剂即能分离得到纯净的溶菌酶。^[13]

我们认为这样简易的提取酶的工作是值得一试,有待开发的、应当将这些工作从实验室走出来,走进工厂造福于民。

总之我国幅员辽阔、物产丰富,有着独特的生产资源,在做动植物酶的工作中也有其领先和优越的地方,比如广西就有剑麻酶、菠萝茎酶、菠萝酶、木瓜酶等几个独省或基本上独省经营的酶种,我们还有许多眼见的资源有待开放,所以在这块土地上,无论是生物工程、酶工程或是遗传工程都将是大有作为的,重要的是我们不可低估了自己的优势。

参考文献

- [1] S Beker Economic Botany, 1958,
- [2] Encyclopedia of Chemical Technology 1980, Vol, 9, P204—205
- [3] Djordjevic veslinka etall, Techol, Mesa, 1973, 14(12)89—394
- [4] Sigmund Schwimmer, Ph, D, Source book of food enzymology, 1981, The AVI Publishing Company INC Westprt, Connecticut, U.S.A.
- [6] Yeshodha, K, Dhar, S, C, Sanfappa, M. (ceuf, leather Res, Inst, Madra, India) Leather Se, 1978, 25 (1), 34—45
- [5] Jdseph M. Dechary, Ecoumic botany, 24, 1980
- [7] Finley, J, W; Stanley, W, L, jwahers, G, G, 1977
- [8] 孙崇莱、叶启腾、科学通报, 25(1980)52, 4
- [9] 沈家柏、叶启腾、广西热作科技1979, 2
- [10] 沈家柏、叶启腾、广西热作科技1980, 1
- [11] 陈石根等, 复旦学报(自然科学版)1979
- [12] 沈家柏、叶启腾, 广西热作科技1982, 1
- [13] 商业部脏器生化制药中心站, 动物生化制药学, P, 335
- [14] 沈家柏, 叶启腾, 第四次全国生化学会论文集。

酒类开发中的有用微生物及其应用

1. 用乳酸菌酿制的多酸酒和大米葡萄酒

在以谷物淀粉质原料酿酒时,必需用曲将

淀粉转化成可发酵性糖类。日本大多使用米曲霉(ASP Oryzae)制成的米曲。米曲霉对日本传统清酒风味的影响很大。而作者在开发新型