

香精的前体,经进一步美拉德反应获得肉味香精等。

功能型肉类抽提物可经高温热处理,而不发生蛋白变性。因其特有的胶黏及持水功能,可添加于火腿肠、香肠等产品中,改善肉制品的胶黏性,切割性,并减少肉制品烹煮损失。功能型肉类抽提物具有高蛋白低脂的组成(典型产品组成如表2所示),强化了产品中蛋白质含量,从而替代一部分肉原料。这类抽提物还能改善肉制品中的风味和蛋白质分布的均一性。

表2 典型功能肉类抽提物组成			
组成	蛋白质	盐/灰分	脂肪
液体型功能抽提物	33%	16%	0~1%
粉末型功能抽提物	90%	9%	1%

4 肉类抽提物的加工工艺

肉类副产品经前处理如粉碎,高温或常温蒸煮后,在一定温度下加入酶制剂进行酶解反应,反应结束后分离出的酶解物经高温灭酶、浓缩、成型等,得到肉类抽提物产品。以诺维信公司的含有外切端肽酶的复合风味蛋白酶(Flavourzyme 500MG)及复合蛋白酶 Promatex 为例,肉类提取物的加工工艺如图2、3所示。通过测定水解液的百利糖度或pH值可以监控水解过程的进程。

其中,以骨为原料时,可以酶解前将骨头进行高温蒸煮,使骨髓中胶原蛋白的渗出并解聚成明胶,从而提高产品的风味。也可将骨粉碎后直接酶解。以1000kg的猪骨为例,按图2工艺可获得200升(蛋白含量40%)浓缩的猪骨的抽提物,同时获得125kg脂肪和125kg(20%蛋白)的不溶蛋白。

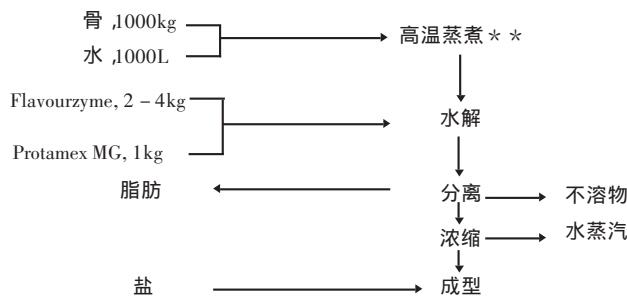


图2 调味型肉类抽提物加工工艺

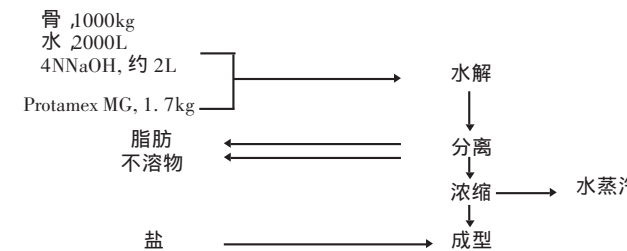


图3 功能型肉类抽提物加工工艺

以1000kg的鸡架骨(蛋白含量18%)为例,按图3工艺可获得360升功能蛋白抽提物(蛋白含量37%)及其它脂肪和蛋白质的不溶物。

5 结论

利用生物酶技术水解低价值的肉类副产品,提高副产品的附加值,对于开发新型天然的食品添加剂,提高大型肉品加工企业的综合效益,具有广阔的应用前景。

脂肪酶催化酯合成

刘毅 杨连生 华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640

摘 要 综述了脂肪酶催化的酯合成反应。脂肪酶的结构决定其催化行为,水可以直接影响酶的水化,或者通过影响反应介质和酶的载体来间接地影响酶的催化。反应介质和载体也经常和影响反应的其他因素发生相互作用,还涉及几种在反应体系中移走水的方法以及由此对反应产生的影响。表面活性物质改性对脂肪酶的影响也得到论述。

关键词 脂肪酶 表面活性物质 界面活化 酯化

Abstract This article discussed the reaction systems employed in ester production catalyzed by lipase. The enzymatic reaction system was a consequence of certain structure patterns of lipases. Water could directly affect the hydration of the enzyme or indirectly change the nature of the reaction media and/or enzyme support materials. The media and enzyme support material often interacted with other factors affecting the reaction. Several methods of water removal and their effectiveness in lipase-catalyzed reaction were discussed. There was a recent surge of interest in modifying lipase systems with surfactants.

Keywords Lipase Surfactant Interfacial activation Esterification

脂肪酶一般来自微生物,其次来自哺乳动物和植物。天然底物是长链脂肪酸三酰甘油酯,根据催化的特异性可以把脂肪酶分成三类:非特异性脂肪酶可以在随机位置水解甘油酯;1,3-特异性脂肪酶在甘油骨架的1位和3位释放脂肪酸;脂肪酶特异性脂肪酶只可以在甘油酯上释放某些特定的脂肪酸。脂肪酶可以用来分对映异构体,催化酯水解反应和酯交换反应,可以用于脂肪裂解、油脂改性、有机化合物合成、洗涤助剂和化学分析过程。

1 结构-功能关系

脂肪酶的分子量在20,000至60,000之间,脂肪酶拥有亲核试剂-组氨酸-酸式残基组成的三元基团,该三元基团是丝氨酸-组氨酸-天冬氨酸或者丝氨酸-组氨酸-谷氨酸。脂肪酶的活性中心经常埋在分子内部,被疏水的环境包围。一个螺旋形的多肽结构作为遮盖物,使得酶的活性中心不易被溶剂和底物接近。脂肪酶具有溶解蛋白的能力,这个螺旋形多肽结构也保护脂肪酶本身免受破坏。Uppenberg等用X-射线研究了来自antarctica假丝酵母的脂肪酶,证明了遮蔽丝氨酸-组氨酸-天冬氨酸活动中心的螺旋形盖状结构的存在,界面活化现象可以激发盖状结构的开启,从而使活性中心暴露出来^[1]。

2 水和有机反应介质对脂肪酶的作用

2.1 水对脂肪酶的作用

底物一般不溶于水,在水相系统的反应产率比较低。Iwai等在水溶液中使用来自niger曲霉,deleamar根霉,白地霉和cyclopium青霉的脂肪酶催化一系列脂肪酸和萜烯醇(香叶醇和法呢醇)的酯化反应,转化率比较低,最高只可达到45%,而niger曲霉脂肪酶基本没有催化活性^[2]。

但是,水有助于保持脂肪酶结构的完整性、活性中心的极性和酶蛋白的稳定性。水可以使得酶分子上的极性残基之间发生疏水相互作用,否则这些极性残基之间会相互结合,使酶失活。脂肪酶的来源不同,在催化过程中需要的水的数量也差异很大。

2.2 有机反应介质对脂肪酶的作用

脂肪酶的天然构型在非水溶剂中变化较小,例如:猪胰腺脂肪酶在有机介质中,活性可以在100℃保持好几个小时,在无水的或者接近无水的溶剂中,可以观察到脂肪酶的活性提高,底物特异性得到改进,对映体选择性也改善。

有机溶剂保持一个较低的水分活度,可以降低酯化和水解反应的热动力学和动力学障碍,另外,有机底物在有机溶剂中较高的溶解度可以提高反应速度,非水体系中的高转化率也简化了分离工艺,脂肪酶在有机溶剂中的溶解度较低,通过在载体上逐步的解吸附作用可以减少酶的损失。若使用低沸点的有机溶剂,最后的产物分离工艺可以进一步得到简化。

2.3 有机反应介质与水的关系对反应的影响

在非水反应介质中,与脂肪酶结合的水可能是体系中唯一

的水,有机溶剂通过直接与酶相互作用或者脱去酶表面的水来影响反应。如果在酶周围的水分较多,超过在酶表面形成一个完整水化层所需水量,这在一定程度上可以保护酶免受有机溶剂导致的失活,但是,多余的水分会影响底物的传质,特别是对于疏水性底物。

脂肪酶分子在无水有机溶剂中的结构比较僵直,不能保证必需的构型变化以给底物在活性中心上提供位置,导致酶的催化活性的下降,Gray研究发现在无水情况下,圆筒状假丝酵母脂肪酶催化的酯交换反应生产丁酸薄荷酯的时候,反应在24小时后会停止,但是,每500活力单位的脂肪酶添加0.1毫升水就可以把酶活性保持到48小时^[3]。

水可以作为放松未折叠和重复折叠的酶分子的润滑剂,但这在恶劣环境条件下会导致酶的失活。因此,在溶剂中的水量应该适当,这对确保高的催化活性是关键的。总的说来,在非水酶学研究中,最好使用与水不混溶的疏水的有机溶剂。水量刚刚低于水与溶剂的饱和界限的时候,是确保催化活性的最佳水量。

酶的活性是有机溶剂的疏水性有关,通过测定有机溶剂的疏水性可以预测有机溶剂是否适合做反应介质,参数一般是 $\log P_{oct}$,定义为一种溶剂在辛醇/水混合物中的分配系数的对数。当 $\log P_{oct}$ 在0.5-2之间, $\log P_{oct}$ 与酶活性的关系不明确。在 $\log P_{oct}$ 等于1.63的无溶剂中进行直接酯化可以得到满意的收率。Claron和AKoh报道说,在 $\log P_{oct}$ 大于等于0.85的有机溶剂中,酯化反应合成香茅醇醋酸酯的转化率可达98%。在高 $\log P_{oct}$ 范围内,随着有机溶剂 $\log P_{oct}$ 增加,酶的活性没有呈现出相同的增加趋势^[4]。

3 酶的载体

脂肪酶价格昂贵,对酶进行再生或者重复利用是重要研究方向。酶的固定化可以在一定程度上保护酶受有机溶剂的钝化,也可以防止酶分子在有机溶剂中的聚集作用。固定化酶适合在连续的填充床或者流化床生产中应用。每个周期以后,由于钝化或者解吸附作用,酶的活性一般会下降。

在非水介质中,载体决定着酶可以利用底物的分配。阴离子交换树脂由于其正电性可以吸附羧酸,造成载体上的底物浓度较高,有利于酶的作用。这就是阴离子交换树脂固定化脂肪酶可以得到很高的酯化反应速度的原因。

固定化也可以提高酶的稳定性,主要是由于载体可以保持酶稳定所需要的相应数量的水。Gray等对圆筒状假丝酵母脂肪酶试验了多种载体,发现在生产第一批产品的时候,在一定条件下,固定化酶的活性远远高于游离酶。固定化脂肪酶,特别是固定在聚乙烯等疏水载体上的脂肪酶,活性高于游离酶^[3]。现在的解释是载体结构提供了一种导向功能。增加了酶和底物的接触机会。

载体的吸水能力用 A_q 来表示,定义为在标准条件下,载体上的水量和溶剂中的水量之比。 A_q 大小受载体与溶剂的相对数量决定,而与溶剂的种类关系不大。 A_q 较高的载体是亲水性的,因此可能夺去酶必需的水化层。一般使用疏水性载体的时

脂酶的活性较高。即使往载体上加水,高 Aq 载体上的酶活性也不如低 Aq 载体上的。

4 在反应体系中移走水的策略

酯化反应的一个主要问题就是如何移走不断产生的水分。活性分子筛或者盐脱水剂可以用来脱除反应产生的水分。Kim 和 Rhee 在真空环境,真空加分子筛环境,真空加分子筛环境而且在反应器的排气管路上加上冷捕集器这三种情况下尝试无溶剂合成法。第三种情况有效地把水在反应体系中移走了,产率最高^[5]。

在 *n*-己烷中的脂肪酶催化反应,De Castro 等尝试把空气喷过酶以除去水分,或者喷空气以后紧接着以丙酮冲洗,或者使用分子筛以除去水分。三种方法导致相似的残留水分^[6]。使用分子筛减少水分含量的时候,反应中形成的水分马上被结合到酶分子上,对于反应的转化率没什么影响。当分子筛与酶的接触时间过长,酯化反应的转化率降低。

由于分子筛的饱和以及再生分子筛需要花费很大的力气,和分子筛一起干燥在工业规模的生物转化中是不可行的。分子筛与水的强亲和力还会导致酶的过度脱水。Mukesh 等利用一个在反应器下游带有一个分隔的分子筛柱的脂肪酶管状再循环系统来解决这些问题。吸收柱的再生可以单独进行,而不用打开酶柱^[7]。

均一的,非多孔多聚物膜可以选择性在吸附反应产生的水。接着通过膜的选择扩散,把水蒸发到气相中,这种除水方法称为全蒸发法。Kwon 等最先采用此法,25℃下,在异辛烷中用脂肪酶催化油酸和 *n*-丁醇的酯化反应。使用醋酸纤维膜进行全蒸发法除水,最后的转化率高达 92%。如果不使用全蒸发法,即使反应时间长达 140 分钟,转化率仍然只有 61%^[8]。

5 在脂肪酶催化的反应中使用表面活性剂

脂肪酶催化反应一般发生在水/油界面处,增加界面面积就可以承载更多的脂肪酶分子,更多的酶可以参加到催化中去,因此可以增加反应速度,把少量水添加到与水不混溶的有机溶剂中,使用某些适当浓度的表面活性剂,可以形成反向胶束系统,反向胶束系统能够提供一个巨大的水/油界面,每毫升微乳剂中的界面面积可达 100 平方米。

在水溶液中,由于静电相互作用和疏水相互作用,阴离子和阳离子表面活性剂通常对酶有钝化作用,非离子表面活性剂除了可以稳定反向胶束系统以外,与酶分子没有静电相互作用,一般不会影响酶的活性。

在反胶束系统中,酶或者与胶束膜发生相互作用,或者溶解在胶束内的水相中。如果酶与胶束膜发生相互作用,当胶束浓度发生变化的时候,会影响酶的活性,如果酶被溶解在水相中,酶的活性就与胶束浓度无关。系统中的胶束浓度由表面活性剂的浓度决定,一般用 W_0 来量度, W_0 定义为水与表面活性剂之比。在固定的 W_0 下,增加表面活性剂的浓度,导致表面面积的增大,当与脂肪酶分子相互作用的胶束数目增加的时候,

脂肪酶在由水相结合入反相胶束系统的时候会发生二级结构的变化。Brown 等观察到 *arrhizus* 根霉脂肪酶活性随着胶束浓度的增加而降低,部分原因是由于脂肪酶在低 W_0 的时候被剥夺了水分^[9]。

在 W_0 较低的情况下,由于酶的脱水和表面张力效应将会发生酶分子的聚集而不能与胶束结合,从而酶的活性较低。在 W_0 较高的情况下,球形胶束水相中的自由水开始妨碍反应的进行,造成酯化反应的热力学障碍和酶分子周围的扩散障碍。脂肪酶分子甚至在界面处被替换下来,从而减少酶和底物碰撞的机会,也就降低了酶的活性^[10]。

Yamada 等使用多种非离子表面活性剂对由 (2-乙基己基) 磺基琥珀酸钠盐 (AOT) 稳定的异辛烷反胶束系统进行了改性。阴离子表面活性剂 AOT 会导致脂肪酶活性下降。在系统中添加非离子表面活性剂可以抑制 AOT 和脂肪酶之间的静电相互作用和疏水相互作用。从而可以防止脂肪酶的钝化^[11]。

生产由表面活性剂包被的脂肪酶最先是 Okahata 和 Ijio 发明的,他们在来自 *deleamar* 根霉, *fragi* 假单胞菌和 *niveus* 根霉的脂肪酶上包被一层合成的非离子二羟基两性分子,后来他们使用表面活性剂包装 *fragi* 假单胞菌脂肪酶,有异辛烷中成功地由外消旋醇和脂肪族羧酸进行了具有对映异构选择性的酯化反应。在疏水有机溶剂中进行了相似的反应,证明被非离子两性分子包被的 *deleamar* 根霉脂肪酶,稳定性和活性都得到提高^[12]。

Isono 等利用 Span60 和假单胞杆菌脂肪酶合成一种脂肪酶-表面活性剂复合物,在 *n*-己烷中催化鲸蜡醇和软脂酸的酯化反应。30 分钟内转化率可达 90%,60 分钟时达到最大转化率 96%^[13]。

表面活性剂也改变酶的热稳定性。假单胞菌脂肪酶-表面活性剂复合物的活性是粉末状酶的 100 倍,并且前者在温度高达 50℃ 的时候仍然保持活性。用不同的表面活性剂对脂肪酶改性后发现,在表面活性剂的碳原子数相同的情况下,带有支链和带有双键的比单纯的直链的改进反应活性的效果明显。

反应的程度与脂肪酶的来源密切相关,反应 24 小时以后,来自猪胰腺,黑曲霉, *javanicus* 毛霉,根霉的脂肪酶经表面活性剂改性以后,转化率也不到 7%,而来自圆筒状假丝酵母的脂肪酶经表面活性剂改性以后转化率可达到 90% 以上。改性的脂肪酶对于 (R)-薄荷醇具有对映异构选择性,产生的 (R)-月桂酸薄荷酯转化率可达 90% 以上,而粉末状酶的转化率只有不到 9%^[14]。

据估计,一个脂肪酶分子可以被包被一层 120-180 个表面活性剂分子。对脂肪酶进行表面活性剂改进也可以影响酶的底物特异性^[15]。表面活性剂对于脂肪酶活性和稳定性的影响紧密依赖于脂肪酶的来源以及表面活性剂的类型和结构。到目前为止,还没有把表面活性剂用于固定化脂肪酶或者无溶剂反应系统的报道。

6 结束语

目前困扰生物催化研究的主要问题是,成本较高,不允许

太多失误,运行的稳定性比较差,这三个因素也是影响生物催化和化学催化竞争的主要问题。正在寻找提高效率 and 降低运行成本的方法,以提高生物催化的竞争力。随着能源价格的上升,也会增加能量密集型化学催化的成本。生物催化成本的优势以及这个领域不断取得的成就将为这项研究提供一个光辉的未来。

参考文献

- 1 Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T. : Crystalization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.* 1994, 235, 790 – 792.
- 2 Iwai, M., Okumura, S., and Tsujisaka, Y. : Synthesis of terpene alcohol esters by lipase. *Agric. Biol. Chem.* 1980, 44, 2731 – 2732.
- 3 Gray, C. J., Narang, J. S., and Barker, S. A. : Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* and its use in the synthesis of menthol esters by transesterification. *Enzyme Microb. Technol.* 1990, 12, 800 – 807.
- 4 Claon, P. A., Akoh, C. C. : Lipase – catalyzed synthesis of terpene esters by transesterification on n – hexane. *Biotechnol. Lett.* 1994, 16, 235 – 240.
- 5 Kim, S. M., Rhee, J. S. : production of medium – chain glycerides by immobilized lipase in a solvent – free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991, 68, 499 – 503.
- 6 De Castro, H. F., Anderson, W. A., Moo – Young, M. : partitioning of water during the production of terpene esters using immobilized lipase. In: *Biocatalysis in Non – Conventional Media*. Elsevier Science publishers B. V., Amsterdam, 1992, 475 – 482.
- 7 Mukesh, D., Jadhav, S., Banerji, A. A. : Lipase – catalyzed esterification reactions – experimental and modelling studies. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1997, 69, 239 – 248.
- 8 Kwon, S. J., Song, K. M., Hong, W. H. : Removal of water produced from lipase – catalyzed esterification in organic solvent by pervaporation. *Biotechnol. Bioeng.* 1995, 46, 393 – 395.
- 9 Brown, E. D., Yada, R. Y., Marangoni, A. G. : The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in aerosol – OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. *Biochem. Biophys. Acta.* 1993, 1161, 66 – 72.
- 10 Stamatis, H., Xenakis, A., Dimitriadis. : Catalytic behavior of *Pseudomonas cepacia* lipase in w/o microemulsions. *Biotechnol. Bioeng.* 1995, 45, 33 – 41.
- 11 Yamada, Y., Kuboi, R., Komazawa, I. : Increased activity of *Chromobacterium viscosum* lipase in aerosol OT reverse micelles in the presence of nonionic surfactants. *Biotechnol. Prog.* 1993, 9, 468 – 472.
- 12 Okahata, Y., Ijiri, K. : Preparation of a lipid – coated lipase and catalysis of glyceride ester syntheses in homogeneous organic solvents. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1992, 65, 2411 – 2420.
- 13 Isono, Y., Nabetani, H., Nakajima, M. : Lipase – surfactant complex as catalyst of interesterification and esterification in organic media. *J. Ferm. Bioeng.* 1995, 80, 170 – 175.
- 14 Kamiya, N., Goto, M. How is enzymatic selectivity of menthol esterification catalyzed by surfactant – coated lipase determined in organic media? *Biotechnol. Prog.* 1997, 13, 488 – 492.
- 15 Tsuzuki, W., Suzuki, T. : Reactive properties of the organic solvent – soluble lipase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1991, 1083, 201 – 206.

基因营养素 – 核酸在固体饮料中的强化探讨

蔺毅峰 山西运城高等专科学校 044000

摘要 利用基因营养素 – 核酸作为强化剂添加在固体饮料中,中老年人通过补充核酸可以养育和修复基因,达到防病治病、延缓衰老、防治心脑血管疾病和糖尿病等目的。本文以基因营养素 – 核酸作为强化剂来生产固体饮料,就其原料、配方、工艺流程、治病机理、有效成分、组织结构、功效作用、吸收性、安全性、可行性等方面进行了详尽的介绍和探讨。

关键词 基因营养素 核酸 固体饮料 强化 功效 工艺

Abstract To produce powder drinks enriched with nucleic acid and gene nutrients this paper mainly discussed their feasibility, absorptivity, safety, efficacy, structure, effective composition, health recovery, technology, formulation and the materials.

The gene enrichment for the elderly and the adults as tested clinically with the effect to delay aging and prevent and cure such diseases as diabetes and cardiocerebrovascular illness.

Key words Gene nutrient Nucleic acid Powder drinks Enrichment Efficacy Technology