

蛋白酶和木瓜酶，远远不能适应我区饮料工业的发展。建议集中力量尽快建立一个酶制剂专业厂。

动 植 物 酶 制 剂

叶启腾 韦永成 陈 强

(广西亚热带作物研究所生化室)

一、国外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，现在已越来越受到人们的重视。

以植物酶来说，国外主要利用对象是植物蛋白水解酶，其中最大一宗酶种是木瓜蛋白酶(Papain)。在整个热带地区都有它的生产和加工场所。单以美国来说，年进口粗木瓜酶即达500吨，世界年产量达600吨。日本的木瓜酶年产量达27吨(单价每Kg15000—20000日元)。它主要用于防止啤酒冷混浊和做肉类嫩化剂。此外，也广泛用于水解蛋白、制药和作为遗传工程的工具酶。法国近年已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。

其次，生产量较大的还有菠萝酶(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。特别值得一提的是，由于上两种酶都是巯基酶，它不似胰蛋白酶之类活性中心含丝氨酸羟基的蛋白酶那样，受许多豆科植物种子内含的抑制物质抑制而降低活性。所以这两种酶在豆制品加工时越来越受到重视。

国外应用较多的还有无花果蛋白酶(Ficin)，基本用于肉类嫩化工业。据报道，这是由于此酶对肌肉蛋白纤维的切点较为合适所决定的。

印度人早就会利用沙漠植物骆驼刺的蛋白酶(Alhagin, jewasee)，它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。

在国外，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。

动物酶的生产 and 应用就更广泛了，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，将这些脏器制成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(rennin)等大量用于食品、医药、轻纺工业的酶制剂。

世界主要酶类销售估算

名	称	销 售 额 (百万美元)	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
lather bating		30	微生物来源
rennets	粗制凝乳酶	30	动物和微生物
glucamylase	淀粉葡萄糖化酶	25	微生物来源
amylases	淀粉糖化酶	21	植物来源
pectinase	果胶酶	6	微生物来源
bromelain	菠萝酶	3	植物来源
all other	其他	20	
total	全部	290	

许多国家从蛋清中分离提取的溶菌酶作为安全的食品防腐剂、杀菌剂和消炎药，也早已形成相当的生产力。

蛇毒除了作为生物工程所必须的工具酶外，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瑞典、美国、英国、丹麦、瑞士分离制成用于心血管疾病的良药。目前我国台湾省的蛇毒就相当程度地占领了国际市场。

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，一般认为效果比水溶性木瓜酶要好，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制取，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方便和优越的地方。

其一，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；其二，不似发酵微生物要消耗大量粮食；其三，生产时排出的废料也远不如发酵时那么多且臭气冲天，不致导致空气和环境污染。最后，它一般也不要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。这样的粗制品即可用于皮革工业。骆驼刺酶用于鞣革的制品亦与剑麻酶相似。蜗牛酶也仅需把蜗牛的消化道冷冻干燥制成干粉就获得了有相当活性的工业酶制剂。当

然,轻纺、制革甚至食品工业所用的动植物蛋白酶往往也只需直接干燥动植物组织做成的制品即可。这不但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因含多种天然保护物质,且加工程序不多,活性保存情况反而较高。众所周知,酶制剂往往越是纯净,其活性降低就越迅速。

可是,将酶进一步纯化的步骤也并不复杂。它的制法也象通常的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透折法提取;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随溶解度不同而达到分离的目的的。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相同,只是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脱去和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这一步,当然细胞内酶的含量较少,提取也较困难,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,尤其是植物酶要注意以上条件。

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无法测出其蛋白酶活性,木瓜和剑麻菠萝的酶均取自皮汁,木瓜酶也只有未成熟的绿果才含有。剑麻酶的含量与植株生长状况极有联系,唯生长旺盛的麻株酶活性高,低产麻比高产麻的酶活性可以相差数10倍。

动物酶的提取则主要是含酶组织局限很大,比如胰蛋白酶、糜蛋白酶仅在动物胰脏含有,只能从胰腺提取。胃蛋白酶仅在动物胃脏存在,因而只能从胃脏提取。

(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,它们都能使蛋白质变性,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,首先它的氨基酸链盘曲折叠以至某几个氨

基酸残基在一级结构中相距很远(氨基酸首尾连接成肽的顺序称为一级结构),而在空间位置相近。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,如果它们的结构或组成被破坏就令酶的生物学活性完全丧失。故凡不利酶活性部位结构的因素都必须避免。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、重金属作用而形成二硫链等令酶失活;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;金属酶则不能接触柠檬酸、乙二氨四乙酸(EDTA)等金属螯合剂。在生产过程中,如上所述的这些因素就必须考虑,否则忽视一点最终将使所得产品毁于一旦。

四、国内动植物酶制剂生产原料现状和展望

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都未见提及动、植物酶。

我国幅原辽阔,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、番木瓜便是富含蛋白酶的植物。菠萝果肉做成罐头后剩下的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一家而已,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。由于产品短缺,价格飞涨。1974年初,南宁罐头厂40万福林单位/g的菠萝酶尚是160元/Kg,1974年中升至240元/公斤至1975年底已升至400元/kg,可见大大供不应求。木瓜酶也有同样现象,产量之少远不足需,按1985年统计,全国仅有与我有联系的5家作坊生产,总产不足1吨。而按“七五”计划,广西生物工程专业组预算,单啤酒一项用酶量即达500吨/年,而我国木瓜酶和菠萝酶年产之和尚未达需求量的千分之三。至于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),每亩地可提酶30000万万单位,比菠萝的含酶活性要高得多,却根本没有得到利用,使大量可制酶的原料都在纤维加工过程中随污水排出,成了公害。

我国的动物脏器酶生产原料的命运也好不了多少。每年宰杀的猪、牛、羊牲畜何止亿万,它们的胰、胃均可加工成酶,包括治蛇伤坏疽、烧伤的灵药胰蛋白酶、胃蛋白酶;治白内障的药物糜蛋白酶;治疗心脏病高血脂的弹性蛋白酶、激肽酶。当然这些酶也多是食品和纺织工业用的重要酶类。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。

我们都知道蜗牛的消化道内确含有高活性的纤维素酶。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,以改变消耗大量粮食的现状。可是在我国,蜗牛酶却只能在一些研究单位做成为数很少的工具酶。

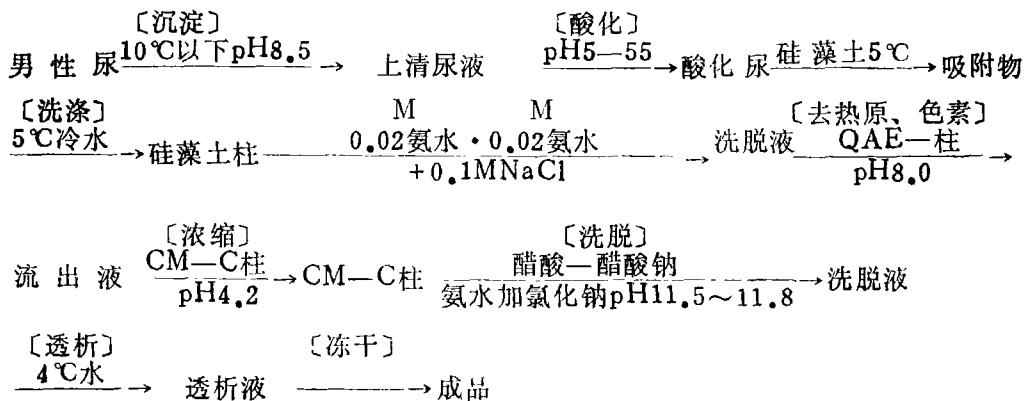
总之南方诸省地处热带、亚热带,且多山地丘陵,有着特殊的生态环境,这是神州其他地方所不能比拟的,所谓山区有山货。上海、北京之类大城市虽有雄厚的技术力量,却无法找到这样好的地理、气候条件。

可以说北纬22度以南，木瓜繁茂；24度以南适于菠萝结实，而至25度剑麻尚能正常生长，至29度凤尾丝兰生势仍很旺盛。此外这些地方也是无花果、猕猴桃、人心果、马来豆、萝摩、牛角瓜、灰叶麻等作物的产地，从这些植物中完全可提取出催化反应专一性各异的酶制剂，最低限度也都将能提取出这些酶的试剂产品，填补我国的空白。

同样，由于南方水面宽阔、在发展鸡、鸭、鹅、鸽等家禽的同时，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，做抑菌剂、抗菌剂或生物工程破除细胞壁的工具酶。这一酶源，在我国南方几乎完全未被开发。

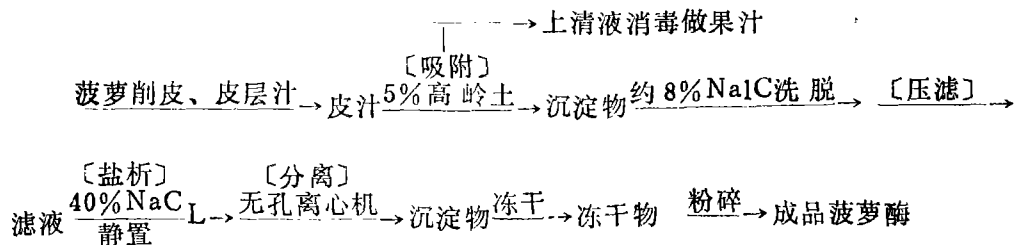
两广、福建受南太平洋季风影响，终年湿度较高，蜗牛品种很多，在广西北海市就有蜗牛牛肉加工基地，蜗牛罐头加工的废料亦可利用，变废为宝，提取出大量的纤维素酶。可以预料，在南海、北部湾广阔的热带海域中，蚌、蛤之类以水草为食物的软体动物消化道内将可测出切点各异，用途广泛的纤维素酶。将其利用则是一笔财富。

众所周知，尿激酶在体内可活血纤溶酶原成为血液纤溶酶。它对血纤维蛋白、血纤蛋白原、凝血因子Ⅳ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ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、风湿的治疗，并用于肿瘤的协同治疗及脏器移植中，因其无毒无副作用，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。它的生产工艺也不算复杂，现列出，供参考：

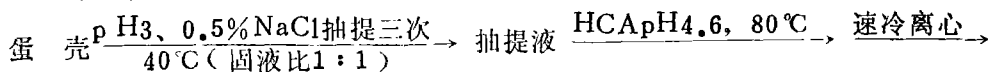


下面再将几个主要推荐开发的酶工艺列出，仅供参考：

①菠萝酶工艺



②溶菌酶生产工艺



上清液 $\xrightarrow{\text{NaOH调PH6} + 10\% \text{聚丙烯酸}}$ 凝聚物 $\xrightarrow{+ \text{Na}_2\text{CO}_3, \text{pH}9.5}$ 物料 静置 \rightarrow
 $\xrightarrow{+ 2\text{NHCl} + 50\% \text{CaCl}_2, \text{pH}6.0}$ 物料 离心 \rightarrow 沉淀 $\xrightarrow{+ \text{NaOH}, \text{PH}9.5}$ 离心 \rightarrow
 $\xrightarrow{\text{NaCl} \rightarrow 5\%}$ 结晶 \rightarrow 重结晶

\rightarrow 上清回收聚丙烯酸

③木瓜酶工艺

木瓜皮乳胶 \rightarrow 液化 $\xrightarrow{+ \text{保护剂}}$ 过滤去杂 \rightarrow 滤液 $\xrightarrow{\text{高速离心}}$ 上清 $\xrightarrow{\text{薄膜浓缩}}$
 浓缩物 $\xrightarrow{\text{喷雾干燥}}$ 干燥物 $\xrightarrow{\text{灭菌}}$ 成品

$\xrightarrow{\text{去淀粉及死蛋白}}$

在使用酶反应器方面，我国是较落后的。我们完全可以象海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，羧甲基纤维素等上），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优质产品，令豆浆通过反应器柱取得水解蛋白。

五、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是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，并选出了较高活性的无花果酶。

（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，浸泡这些定性滤纸，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。我们以为好似这种简单方便的普查形式在南方技术力量不足、设备也很少的情况下是可以发挥大作用的。

（三）利用亲和层析提取纯酶制剂

将动植物浆用稀盐溶液泡浸溶解出含酶液后，离心去除沉淀的杂物，这时可采用亲和层析一步提出纯酶。该法是利用抗体与抗原、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、酪氨酸、精氨酸（BZI）做配基的层抗柱，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（PH4.6）做洗脱剂即能分离得到纯净的溶菌酶。

我们认为这样简易的提取酶的工作是值得—试、有待开发的，应当从实验室走出来，走进工厂造福于民。

总之我国南部亚热带地域物产丰富，有着独特的酶生产资源，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、木瓜酶等几个独省经营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发。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。

质粒和发酵工业

汪一平

(广西医学院)

发现细菌中的质粒(Plasmid)已经有40年的历史了，开始只在大肠杆菌中发现有质粒，现在已普遍接受大多数细菌都有质粒这样的观点了，质粒的定义正在被推广，泛指那些不依附于细菌染色体，能够稳定遗传的DNA分子。质粒是分子水平的生命体，对宿主细菌并非必需的，然而有的质粒能够赋予宿主某些遗传特性，如抗药性，降解有机物，产生细菌素、致病性等，增加细菌对环境的适应力。

70年代，质粒生物学发生了重大变革。质粒首次被作为基因载体，在原核细胞中表达了真核基因，显示出了质粒对物种改造的巨大潜力，并终于导致了70年代后期生物工程(Biotechnology)的兴起。传统的发酵工业也受到了冲击，发酵工业不再是“发酵技术”而成为“发酵科学”了。发酵科学包括了遗传、代谢调控、细胞外环境控制三个不同层次的内容。一项好的发酵设计应当综合考虑这三方面内容的相互联系，达到高产、低耗、优质、安全的目的。

这种优化设计往往要从菌种开始，菌种很主要地决定了产量的高低。由于70年代质粒生物学的进展，在发酵工业中已经可以创造一些自然界没有的高产工程菌(engineering-bacteria)来取代传统的工业菌株。英国的帝国化学工业公司在1968年就从几千种分离物中分离出可利用甲醇为碳源的甲醇菌，但利用率不高。后来，该公司利用基因工程将一个关键酶的基因从大肠杆菌转移到甲醇菌中，这样就降低了能量消耗，更多地积累蛋白质，其含量可高达菌体重量的72%。1972年中试，1976年就开始建造直径8米，高60米，容量150立方米，年产5~15万吨单细胞蛋白质的连续发酵塔，经177次动物试验证明产品无毒性。1983年正式投产，是目前最大的发酵工程。

谷氨酸发酵工业已有近30年的历史了，现在谷氨酸的生产水平达60~120克/升。传统的方法是选育抗代谢和自养突变型的菌株而获得高产的。因为所诱导的积累突变株已经彻底或是走向彻底破坏氨基酸合成途径的反馈调节，所以诱变技术发展到现在阶段之后很难再提高菌株的产量了。另一种更合理的方法是把谷氨酸基因克隆在质粒上，创造一种专门高产谷氨酸