

第六章 酶

第一节 概述

酶 (enzyme) 是一类具有很强催化活性的蛋白质, 存在于一切生物体内, 由生物细胞合成, 并参与新陈代谢有关的化学反应。所以, 在食品中涉及到许多酶催化的反应, 它们对食品的品质产生需宜或不需宜的影响和变化, 例如, 水果、蔬菜的成熟, 加工和贮藏过程中的酶促褐变引起的颜色变化、某些风味物质的形成、水果中淀粉和果胶物质的降解, 肉类和奶制品的熟化, 以及发酵生产的酒精饮料等。有时为了提高食品品质和产量, 在加工或贮藏过程中添加外源酶, 例如利用淀粉酶和葡萄糖异构酶以玉米淀粉为原料生产高果糖玉米糖浆, 牛乳中添加乳糖酶以解决人群中乳糖酶缺乏的问题。在食品贮藏和热处理过程中, 常常根据组织亚细胞结构中酶的分布模式和活性的变化, 作为评价处理效果的一项指标, 例如在牛奶、啤酒和蜂蜜的巴氏灭菌中了解消毒的效果; 区别新鲜和冷冻的肉与鱼类食品。食品成分的分析中, 常常利用酶的专一性和敏感性测定食品原料与产品的组成变化, 达到控制质量的目的。关于酶的本质和基础理论在生物化学中已有详细介绍, 因此, 本章着重介绍酶在食品加工和贮藏过程中的特点、作用, 及与此相关的一些基本知识。

一、酶的化学本质

人们对酶的认识起源于生产实践。我国几千年前就开始制作发酵饮料及食品, 夏禹时代, 酿酒已经出现, 周代已能制作饴糖和酱。春秋战国时期已知道用曲治疗消化不良。西方国家 19 世纪初曾提出引起某些化学反应的物质, 并对酒的发酵过程进行了大量研究。1878 年提出了“酶”这个名称, 已知生物体系中的化学反应很少是在没有催化剂的情况下进行的, 这些催化剂是称为酶的专一蛋白质。酶的突出特征是它们的催化能力和专一性, 酶加快反应速率至少是一百万倍, 最高可达 10^{17} 倍 (如 OMP 脱羧酶)。酶在被催化的反应上以及选择被称为底物的反应物上, 都是高度专一的。

千万种蛋白质已被提纯, 并已证明它们有酶促活力。20 世纪 80 年代以前一致相信所有的酶都是蛋白质, 后来核糖酶 (ribozymes) 的发现, 表明 RNA 分子也可能像蛋白质一样, 是有高度催化活性的酶。此外, 在有些酶中除蛋白质外还含有另外的一些成分, 例如碳水化合物、磷酸盐和辅酶基团。实际上生物体内除少数几种酶为核糖核酸分子外, 大多数的酶类都是蛋白质。但

是，也还必须注意到：蛋白质不是生物催化领域唯一的物质。目前食品工业中应用的酶都是蛋白质，下面章节中提及的酶，也都专指化学本质为蛋白质的酶。

酶是球形蛋白质，它同其他蛋白质一样，由氨基酸组成，也具有两性电解质的性质，并具有一、二、三、四级结构。因而也受到环境因素的作用而变化或沉淀，乃至丧失酶活性。酶的相对分子质量一般为 13k~1000k 范围。酶中的蛋白质有的是简单蛋白，有的是结合蛋白，后者为酶蛋白与辅助因子结合后形成的复合物。根据酶蛋白分子的特点可将酶分为三类，即单体酶，只有一条具有活性部位的多肽链，相对分子质量在 13k~35k 之间，例如溶菌酶、胰蛋白酶等，属于这一类的酶很少，一般都是催化水解反应的酶；寡聚酶，由几个甚至几十个亚基组成，这些亚基可以是相同的多肽链，也可以是不同的多肽链。亚基间不是共价键结合，彼此很容易分开。相对分子质量从 35k 到几百万，例如磷酸化酶 a 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶等；多酶体系是由几种酶彼此嵌合形成的复合体，相对分子质量一般都在几百万以上，例如脂肪酸合成的脂肪酸合成酶复合体。

酶的辅助因子包括金属离子（例如 Fe、Cu、Zn、Mg、Ca、Na、K 等）及有机化合物，它们本身无催化作用，但一般在酶促反应中运输转移电子、原子或某些功能基团，如参与氧化还原或运载酰基的作用。有些蛋白质也具有此种作用，称之为蛋白辅酶。与酶蛋白成松散结合的辅助因子，在大多数情况下，可以通过透析或其他方法将它们从全酶中除去，这种辅助因子称为辅酶（cofactor 或 coenzyme）。但是，也有少数辅助因子是以共价键和酶蛋白牢固结合在一起，不易透析除去，这种辅助因子称为辅基（prosthetic group）。

二、酶的特征

1、酶的催化作用

酶的显著特征是催化作用和专一性，酶是一种生物催化剂，除具有一般催化剂的性质外，还显示出生物催化剂的特性：酶的催化效率高，以分子比表示，酶催化反应的反应速率比非催化反应高 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍，比其他催化反应高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。以转换数 kcat 表示，大部分酶为 1000，最大的可达几十万，甚至一百万以上，酶的作用具有高度的专一性（Specificity），一种酶只能作用于一种或一类底物，比其他一般催化更加脆弱，容易失活，凡使蛋白质变性的因素都能使酶破坏而完全失去活性。所以，酶作用的条件一般都比较温和，酶活力的调控在生物体的生命活动中起着重要的作用，酶的催化活力与其辅基和金属离子密切相关。

酶的催化反应，如同所有的化学反应一样都需要服从热力学定律。当考虑放热反应中的催化作用时，反应底物分子A生成产物B的活化能为 ΔE 是相当高的，在大多数情况下，这样的反应不能自发进行，反应物A处于亚稳态。在加入合适的催化剂后，使A转化为活化能较低的过渡态，形成中间产物EA或EP（图 6-1），最后释放出产物P和游离的催化剂。在催化反应过程中，反应速率常数增大几个数量级，但反应平衡常数不变。由于酶的高度催化活性，在体外实验中，仅需要 $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的酶，催化就已经相当显著。但是在活细胞中酶的浓度则高出很多。

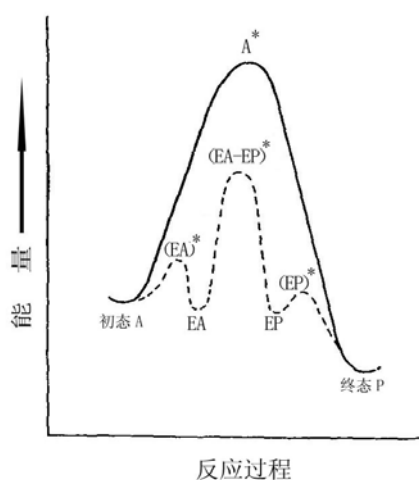


图 6-1 在非催化和酶催化过程自由能的变化
 $A \rightarrow P$; ——没有催化剂;有催化剂 E

表 6-1 列出了催化剂对某些反应的活化能和反应速率的影响。

表 6-1 催化剂对某些反应的活化能和反应速率的影响

反 应	催 化 剂	活 化 能 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	速 率 常 数 $K_{\text{rel}} (25^\circ\text{C})$
$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2$	无	75	10
	I^-	56.5	$\sim 2.1 \times 10^3$
	过氧化氢酶	26.8	$\sim 3.1 \times 10^8$
酪蛋白+n $\text{H}_2\text{O} \rightarrow (n+1)$ 肽	H^+	86	1.0
	胰蛋白酶	50	$\sim 2.1 \times 10^6$
乙酸丁酯+ $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ 丁酸+乙醇	H^+	55	1.0
	脂肪酶	17.6	$\sim 4.2 \times 10^6$

蔗糖+H ₂ O→葡萄糖+果糖	H ⁺	107	1.0
	转化酶	46	~5.6×10 ¹⁰
亚油酸+O ₂ →亚油酸氢过氧化物	无	150~270	1.0
	Cu ²⁺	30~50	~10 ²
	脂肪氧合酶	16.7	~10 ⁷

2、酶的专一性

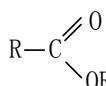
酶除了能显著提高反应速率外，还具有很高的专一性，它只能催化一种或一类化学反应（反应专一性），而且对底物有严格的选择（底物专一性）。另外变构酶还具有调节专一性的作用。

（1）酶的底物专一性

酶的底物专一性（Substrate specificity）即特异性是指酶对它作用的底物有严格的选择性，酶专一性分为两种类型：

①结构专一性：有些酶对底物的要求非常严格，只作用于一个底物，而不作用于任何其他底物，这种专一性称为“绝对专一性”。例如脲酶只能催化尿素水解，而对尿素的衍生物不起作用。麦芽糖酶只作用于麦芽糖而不作用于其他双糖。

有些酶对底物要求比上述绝对专一性略低一些，它的作用对象不只是一种底物，这种专一性称为“相对专一性”。这些酶对键两端的基团要求程度不同，只对其中一个基团要求严格，而对另一个则要求不严格，这种专一性称为“族专一性”或“基团专一性”，这方面是有一些差异的。对于少部分酶是基团专一性，例如水解酶，其中胰蛋白酶只能水解精氨酸或赖氨酸残基的羧基形成的肽键或酯键。此性质常用于蛋白质序列的分析之中。另外一种相对专一性的酶是只作用于一定的键，对键两端的基团并无严格要求，称为“键专一性”，这类酶对底物的结构要求最低，例如酯酶催化酯键的水解，而对底物



中的 R 及 R' 基团则没有严格的要求，它既能催化水解甘油酯类、简单脂类，也能催化丙酰、丁酰胆碱或乙酰胆碱等，只是对于不同的脂类，水解速率有所不同。大多数酶催化反应仅对一种底物起作用或优先催化一种底物，如脲酶。酶的这种专一性评价，只有对纯酶而言才是可靠的，然而在食品中应用的酶多数是由几种酶组成的混合物，同时还含有其他杂质，因此，

不容易对这些酶的专一性作确切评价。

②立体专一性 (Stereospecificity): 酶的立体专一性非常明显, 对于一些含有手性基团的化合物, 存在光学或立体异构体, 而某些酶能够识别底物的顺、反异构或旋光异构体, 也就是只能催化一个对映异构体, 而对另外一个对映体则没有作用。因此, 可利用酶的这个性质分离手性化合物。酶的立体专一性在食品分析和加工中是非常重要的。

(2) 酶反应专一性

酶反应专一性 (Reaction specificity) 是指底物在允许的儿个热力学反应中, 只有一个反应可以被酶催化。酶的分类和命名是以酶反应的专一性, 而不是底物专一性为依据的。

3、酶的催化理论

研究证明任何酶与底物作用, 酶的特殊催化作用只局限于它的大分子的一定区域。对于不需要辅酶的酶来说, 酶的活性中心就是指起催化作用的基团在酶的三级结构中的位置, 这些基团在一级结构上可能相差甚远, 甚至位于不同的肽链上, 但是它们通过肽链的盘绕、折叠而在空间构象上相互靠近。对于需要辅酶的酶来说, 辅酶分子或辅酶分子的某一部分结构往往就是活性中心的组成部分。确定酶的活性中心有助于研究酶的专一性。

为了解释酶的催化理论, 早期 E. Fisher 提出了“模板”(template) 或锁与钥匙学说 (lock and key theory), 认为底物分子或底物分子的一部分像钥匙, 而酶比喻为锁。底物专一地楔入到酶的活性中心部位, 也就是说底物分子进行化学反应的部位与酶分子上有催化效能的基团间有紧密互补的关系 (图 6-2)。

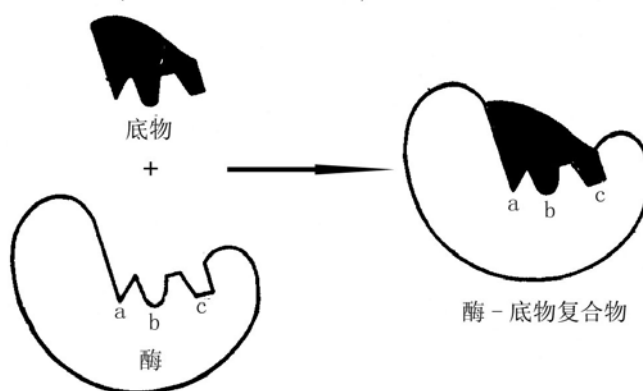


图 6-2 酶专一性的锁和钥匙机制

利用“Fisher”的理论还不能解释酶的结构既适合于可逆反应的底物, 又适合于可逆反应的产物, 而且也不能解释酶的专一性中的所有现象。在催化时, 很多酶的构象在与底物结合时发生了变化。Koshland 后来在 1958 年提

出了“诱导契合”(induced-fit hypothesis), 当酶分子与底物接近时, 酶蛋白受底物分子的诱导, 其构象发生有利于与底物结合的变化, 酶与底物在此基础上互补契合, 进行反应(图 6-3)。以后 X-射线衍射分析的实验结果支持了这一假说, 证明了酶与底物结合时, 确有显著的构象变化。

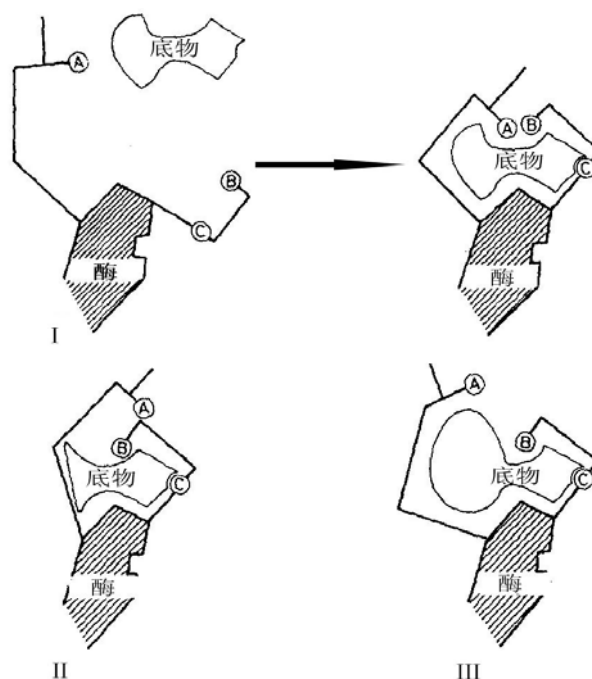


图 6-3 酶与底物专一催化作用的“诱导契合”机制示意图

事实上, 通过旋光测定, 了解到许多酶在它们的催化循环中的确有构象变化, 特别是 X-射线衍射分析发现未结合在游离羧酸酐酶与结合了甘氨酸酐氨酸底物的羧酐酶在构象上有很大区别。

三、酶的命名与分类

1. 习惯命名法

1961 年以前使用的酶的名称都是沿用习惯命名, 比较简单, 应用历史较长, 但缺乏系统性。有时出现一酶数名或一名数酶的情况。但由于沿用已久, 尽管容易混淆, 但仍然使用。习惯命名的 4 个原则是: ①绝大多数酶依据其底物来命名, 如淀粉酶、蛋白酶; ②根据其所催化的反应性质来命名, 如水解酶、转氨酸、氧化酶; ③根据作用底物和反应性质两个原则来命名, 例如琥珀酸脱氢酶; ④在上述基础上加上酶的来源或酶的其他特点进行命名, 如胃蛋白酶、胰蛋白酶等。

2. 国际系统命名法与分类

1961 年国际生化协会酶学会议上提出了一个新的系统命名与分类的原

则，已为国际生化协会所采用。1992 年对此进行了修改。按照国际系统命名法原则，每一种酶有一个系统名称和习惯名称，前者必须明确标准酶的底物及催化反应的性质，每个酶有一个特定的编号。这种系统命名原则及系统编号是相当严格的。

国际系统分类的原则是将所有的酶促反应按反应性质分为 6 大类，分别用 1、2、3、4、5、6 的编号表示，再根据底物中被作用的基团或键的特点将每一大类分为若干个亚类，每一个亚类又按顺序编成 1、2、3、4...等数字，每一个亚类可再分为若干个亚-亚类，仍用 1、2、3、4...编号。每一种酶都被指定为一个由 4 位数字组成的酶委员会编号 (EC number)。例如黄嘌呤氧化还原酶的系统命名为 EC 1.2.3.2。其中第一个数字指明该酶属于 6 大类中的哪一类；第二个数为酶属的亚类；第三个数字是该酶所属的亚-亚类；第四个数字则表明该酶在一定亚-亚类中的排号。—表 6-2 列出了食品中的一些重要酶的系统分类。

表 6-2 食品中的一些重要的酶分类

类和亚类	酶	EC 编号
1. 氧化还原酶		
1.1 供体为 OH-OH		
1.1.1 受体为 NAD ⁺ 或 NADP ⁺	乙醇脱氢酶	1.1.1.1
	丁二醇脱氢酶	1.1.1.4
	L-艾杜糖醇-2-脱氢酶	1.1.1.14
	L-乳糖脱氢酶	1.1.1.27
	苹果酸脱氢酶	1.1.1.37
	半乳糖-1-脱氢酶	1.1.1.48
	葡萄糖-6-磷酸-1-脱氢酶	1.1.1.49
1.1.3 受体为氧	葡萄糖氧化酶	1.1.3.4
	黄嘌呤氧化酶	1.1.3.22
1.2 供体为醛基		
1.2.1 受体为 NAD ⁺ 或 NADP ⁺	醛脱氢酶	1.2.1.3
1.8 供体为含硫化物		
1.8.5 受体为醌或醌类化合物	谷胱甘肽脱氢酶	1.8.5.1
1.10 体供为二烯醇或二酚		
1.10.3 受体为氧	抗坏血酸氧化酶	1.10.3.3
1.11 受体为氢过氧化物	过氧化氢酶	1.11.1.6
	过氧化物酶	1.11.1.7
1.13 作用于单一供体		
1.13.11 与分子氧结合	脂肪氧合酶	1.13.11.12

1.14 作用于一对供体	一元酚单加氧酶 (多酚氧化酶)	1.14.18.1
2 转移酶		
2.7 转移磷酸		
2.7.1 受体为 OH	己糖激酶	2.7.1.1
	甘油激酶	2.7.1.30
	丙酮酸激酶	2.7.1.40
2.7.3 受体为 N-基	肌酸激酶	2.7.3.2
3 水解酶		
3.1 切断酯键		
3.1.1 羧酸酯水解酶	羧酸酯酶	3.1.1.1
	三酰甘油酯酶	3.1.1.3
	磷酸酯酶A ₂	3.1.1.4
	乙酰胆碱酯酶	3.1.1.7
	果胶甲酯酶	3.1.1.11
	磷酸酯酶A ₁	3.1.1.32
3.1.3 磷酸单酯水解酶	碱性磷酸酯酶	3.1.3.1
3.1.4 磷酸双酯水解酶	磷脂酶 C	3.1.4.2
	磷脂酶 D	3.1.4.4
3.2 水解 O-糖基化合物		
3.2.1 糖苷酸	α -淀粉酶	3.2.1.1
	β -淀粉酶	3.2.1.2
	葡糖糖化酶	3.2.1.3
	纤维素酶	3.2.1.4
	聚半乳糖醛酸酶	3.2.1.15
	溶菌酶	3.2.1.17
	α -D-糖苷酶 (麦芽糖酶)	3.2.1.20
	β -D-糖苷酶	3.2.1.21
	α -D-半乳糖苷酶	3.2.1.22
	β -D-半乳糖苷酶 (乳糖酶)	3.2.1.23
	β -呋喃果糖苷酶 (转化酶或蔗糖酶)	3.2.1.26
	1,3- β -D-木聚糖酶	3.2.1.32
	α -L-鼠李糖苷酶	3.2.1.40
	支链淀粉酶	3.2.1.41
	外切聚半乳糖醛酸酶	3.2.3.67
3.2.3 水解 S-糖基化合物	葡糖硫苷酶 (黑芥子硫苷酸酶)	3.2.3.1
3.4 肽酶		

3.4.21 丝氨酸肽键内切酶	微生物丝氨酸肽键内切酶如枯草杆菌蛋白酶	3.4.21.62
3.4.23 天冬氨酸肽键内切酶	凝乳酶	3.4.23.4
3.4.24 金属肽键内切酶	嗜热菌蛋白酶	3.4.24.27
3.5 作用于除肽键外的 C-N 键		
3.5.2 环内酰胺中	肌酸酐酶	3.5.2.10
4 裂解酶		
4.2 C-O-裂解酶		
4.2.2 作用于多糖	果胶酸裂解酶	4.2.2.2
	外切聚半乳糖醛酸裂解酶	4.2.2.9
	果胶裂解酶	4.2.2.10
5 异构酶		
5.3 分子内氧化还原酶		
5.3.1 醛糖和酮糖间的互变	木糖异构酶	5.3.1.5
	葡萄糖-6-磷酸异构酶	5.3.1.9

四、生物体中的酶

自然界所有的生物体中都含有许多种类的酶，一些特殊的酶仅存在于细胞内的一类细胞器中。细胞核中含有的酶主要涉及到核酸的生物合成和水解降解，线粒体中含有与氧化磷酸化和生成 ATP 有关的氧化还原酶。细胞中的许多酶常常在一个连续的反应链中起作用。酶在生物体内是非均匀分布的，特定的器官含有特定的酶，在植物组织中这些酶随着生长、发育，其数量将会发生变化，有的甚至十分显著。

在完整细胞内，许多多酶体系具有自我调节的能力，酶的活力一般是通过以下几种方式控制：隔离分布在亚细胞膜内，被细胞器控制；酶结合于膜或细胞壁上；酶作用的底物结合于膜或细胞壁；酶与底物分离。此外，还可以通过依靠酶原的生物合成和生理上重要的内源酶抑制剂控制。

一旦组织受损将使酶与底物接近，导致食品在色泽、质地、风味和营养上的改变。因此，热处理、低温保藏和酶抑制剂的使用均有利于稳定产品质量。

食品加工的生物材料中含有数以百计的不同种类的酶，这些酶对于原料的生长、成熟、加工和保藏等均起着重要的作用。表 6-3 列举了一些食品原料中几种酶的相对含量。可见不同的植物中各种酶的含量差异较大。

表 6-3 不同原料中几种酶的相对含量

酶	来源	相对含量(%)
聚半乳糖醛酸酶	番茄	1.0
	鳄梨	0.065
	欧楂 (Medlar)	0.027
	梨	0.016
	菠萝	0.024
	胡萝卜	0
	葡萄	0
脂肪氧合酶	大豆	1.00
	摩尔拉豆 (Urd bean)	0.64
	绿豆	0.47
	碗豆	0.32
	小麦	0.02
	花生	0.01
过氧化物酶	青刀豆	1.00
	豆荚	0.72
	菜豆	0.62
	菠菜	0.32
	利马豆	0.15

多酚氧化酶是植物中最受注意的一种酶，在葡萄、洋李、无花果、枣、茶叶和咖啡豆中含量很高，它在这些果实中起着人们期望的作用。另外，多酚氧化酶在桃、苹果、香蕉、荔枝、马铃薯、莲藕和莴苣中的含量也是相当高，然而它对这些果实起着不需宜的作用，易引起褐变，造成变质和腐烂，对于新鲜果实的保藏带来极大困难。胡椒中不存在多酚氧化酶。

酶在食品中的活力与其生长环境和成熟度有关，从而给生产质量的稳定性带来诸多不便。幸运的是，酶变性的速率依然遵循一级反应动力学，因此，酶失活到一定程度所需的时间与酶的浓度无关。然而不同起始浓度的酶失活，即使将酶失活到相同的百分数，但剩余的绝对酶活仍然是不同的。对于起始浓度高的酶，完全失活则需要较长时间。食品原料中的同功酶往往具有不同的热稳定性。

五、酶的分离纯化与活力测定

1、酶的分离纯化

食品工业中使用的酶大多数对酶的纯度要求不高，然而在某些特殊的情况下却需要纯酶制剂，如在研究酶的结构、功能、生物学作用和理化性质，对酶进行鉴定，必须采用纯酶，作为生化试剂和药物酶对酶的纯度要求也高。

根据酶在体内作用的部位，可以将酶分为胞外酶和胞内酶两大类。胞外酶易于分离，而胞内酶存在于细胞内，必须破碎细胞才能进行分离。根据酶是蛋白质这一特性，可采用提纯蛋白质的方法进行分离纯化。

酶是生物活性物质，在提纯时必须考虑尽量减少酶活力的损失，全部操作需要在低温下进行。一般在 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 范围，当用有机溶剂分级分离时应在 $-15^{\circ}\text{C}\sim -20^{\circ}\text{C}$ 进行。在抽提溶剂中加入 EDTA 可螯合重金属，以防止酶失活；对于含-SH 的酶蛋白，需要加入少量巯基乙醇防止-SH 氧化。干燥常采用真空冷冻干燥，以减少酶活的损失。酶制品在一般在 -20°C 以下低温保存。

2. 酶活力的测定

酶活力 (enzyme activity) 也称酶活性，是指酶催化一定化学反应的能力。酶活力的大小可以用在一定条件下，它所催化的某一化学反应的反应速率来表示，即酶催化的反应速率愈快，酶的活力就愈高，反之，速率愈慢，酶的活力就愈低。所以测定酶的活力就是测定酶促反应的速率。而酶反应速率可用单位时间内，单位体积中底物的减少量或底物的增加量来表示。因此，酶的活力大小是以酶的活力单位为根据而定义。

1961 年国际酶学会议规定，1 个酶活力单位，是指在特定条件下，在 1min 内能催化 $1\mu\text{mol}$ 底物的量，或是转化底物中 $1\mu\text{mol}$ 有关基团的酶量，称为国际系统单位 SI，即 kat。特定条件：温度选定为 25°C ，其他条件 (如 pH 及底物浓度) 均采用最适条件。

酶活力单位只能作为相对比较，并不直接表示酶的绝对量，因此实际上还需要测定酶的比活力 (Specific activity)，也就是酶含量的大小，即每 mg 酶蛋白所具有的酶活力，**一般用 (U/mg 蛋白质) 表示。有时也用 U/g 或 U/ml 表示。**可以作为比较每单位酶蛋白的催化能力。对同一种酶而言，比活力愈高，表示酶愈纯。

第二节 酶的催化反应动力学

酶催化反应动力学研究酶催化反应的速率，以及影响反应速率的各种因素。食品中的酶仅能通过间接测定它们的催化活性而与其他酶区别，下面分别讨论反应速率与反应物的浓度 (主要指酶和底物)、活化剂与抑制剂、pH、温度、反应介质的离子强度、水活性，以及其他环境条件的相关性。

一、底物浓度的影响

1、米氏学说的意义

早在 20 世纪初就已经观察到了酶被底物饱和的现象，而这种现象在非酶催化反应中则是不存在的。实际上底物对酶反应速率的影响比较复杂。以反应速率 v 对底物浓度 $[S]$ 作图(图 6-4)，可以看到当底物浓度较低时，反应速率与底物浓度的关系是呈正比关系，为一级反应，之后随着底物浓度的增加，反应速率不是成直线增加，这一段反应表现为混合级反应。如果再继续加大 $[S]$ 底物浓度，曲线表现为零级反应，反应速率趋向一个极限。说明酶已被底物饱和。这可以用 1913 年前后 Michaelis 与 Menten 提出的学说解释。首先考虑单一底物的反应，酶(E)与底物(S)形成复合物 $E \cdot S$ 。

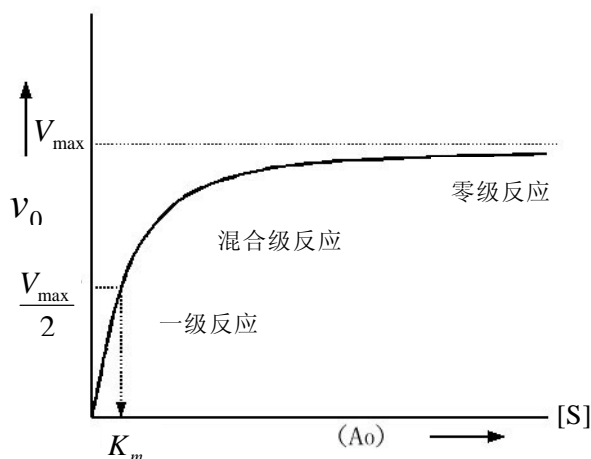
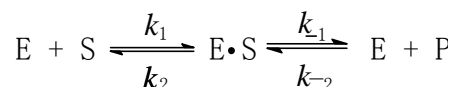


图 6-4 酶反应速率与底物浓度的关系

然后 $E \cdot S$ 释放出产物 P 及游离形式的酶：



已知在最高活性反应， $E \cdot S$ 的形成速率与 $E \cdot S$ 的分解速率达到平衡前，持续大约 5msec。

在讨论上述反应时，首先假设：

(1) 底物浓度远大于酶的浓度，即 $[S]_0 \gg [E]_0$ ，大多数酶促反应的 $[S]_0$ 在 $10^{-4} \sim 10^{-2} \text{ mol/L}$ 范围， $[E]_0$ 为 $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$ ，因此被酶结合的 S 量，亦即 $[E \cdot S]$ ，

它与总的底物浓度相比，可以忽略不计。

(2) 产物 P 的浓度接近 0 时，不存在逆反应，即讨论酶反应初始速率。

(3) k_2 控制生成产物 P 这一步的速率，远小于酶-底物配合物释放出底物这一步的反应速率常数 k_{-1} 。因此， k_2 为限制整个反应速率的反应速率常数， k_{-2} 接近 0。E 和 E·S 基本上处于平衡状态。

一般地说，上述假设是符合实际情况的，当达到平衡时上式可以写为：

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] \quad (6-1)$$

$$[E] = \frac{k_{-1}[ES]}{k_1[S]} \quad (6-2)$$

然而，在反应中总的酶浓度 $[E]_t$ 必须等于游离酶的浓度 $[E]$ 和 $[E \cdot S]$ 之和，即 $[E]_t = [E] + [E \cdot S]$ 。代入 (6-2) 式可得：

$$[E]_t = [E \cdot S] \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_1[S]} \right) \quad (6-3)$$

由于 k_2 是限制步骤的反应速率常数，因此整个反应速率 $v = k_2 [E \cdot S]$ 于是

$$v = \frac{k_2[E]_t}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1[S]}} = \frac{k_2[E]_t[S]}{[S] + \frac{k_{-1}}{k_1}} \quad (6-4)$$

式中常数 $\frac{k_{-1}}{k_1}$ 称为米氏常数 (Michaelis constant) 或 K_m 。当底物浓度很高时，所有的酶都被底物所饱和，并变成 E·S 复合物，即 $[E] = [E \cdot S]$ 时，酶促反应达到最大速率 V_{\max} ，所以

$$V_{\max} = k_1 [E \cdot S] = k_2 [E]_t \quad (6-5)$$

用 (6-4) 除以 (6-5) 得：

$$\begin{aligned} \frac{v}{V_{\max}} &= \frac{k_2[E]_t[S]}{k_2[E]_t([S] + K_m)} \\ v &= \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} \end{aligned} \quad (6-6)$$

这就是米氏方程 (Michaelis-Menten 方程)，它表明了当已知 K_m 和 V_{\max} 时，酶反应速率常数与底物浓度之间的定量关系。

利用米氏方程讨论与实验所得到的曲线 (图 6-4) 之间的关系。当 $[S] \ll K_m$ 时，式 (6-6) 可以近似地表示为 $v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m}$ ，于是 v 正比于 $[S]$ ，即与曲线初始阶段的一级反应相符。然而，随着 $[S]$ 的增加 K_m 与 $[S]$ 相比可以忽略时，则 $v = V_{\max}$ 。可见利用米氏方程讨论的结果与实验得到的曲线是一致的。说明米氏方程为单分子酶反应提供了一个很好的模型。

当酶促反应处于 $v=1/2 V_{\max}$ 的特殊情况时:

$$\frac{v_{\max}}{2} = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (6-7)$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (6-8)$$

$$\therefore [S] = K_m$$

由此可知 K_m 的物理意义, 即 K_m 值是当酶反应速率达到最大反应速率一半时的底物浓度, 它的单位为 mol/L。

米氏常数是酶学研究中的一个极为重要的常数, 现作如下分析:

- (1) K_m 是酶的特征常数之一, 一般只与酶的性质有关, 而与酶浓度无关。
- (2) 如果一个酶有几种底物, 则每一种底物对映一个特定的 K_m 值, K_m 与 pH 和温度有关。因此, K_m 作为常数是在 pH 和温度一定时, 对一定底物而言。
- (3) 同一种酶有几种底物时, 其中 K_m 最小的底物一般称为该酶的最适底物或天然底物。

$1/K_m$ 可近似地表示酶对底物亲和力的大小, $1/K_m$ 愈大, 表明酶的亲和力愈大, 也就是说达到最大反应速率一半所需要的底物浓度就愈小。

(4) K_m 不等于 k_{-1} , 只有在 $k_2 \ll k_1, k_{-1}$ 时, K_m 才可看作是 k_{-1} (这里的 k_{-1} 实际上是 $E \cdot S$ 的解离平衡常数, 而不是 $E + S$ 生成 $E \cdot S$ 的平衡常数)。在某些酶催化反应中, 形成 $E \cdot S$ 的平衡迅速建立, $E \cdot S$ 形成的速率大大地超过 $E \cdot S$ 分解为产物的速率, 例如胰蛋白酶、转化酶、乳酸脱氢酶、脂酶等。因此 k_1, k_{-1} 远远大于 k_2 , 在这种情况下 $E \cdot S \xrightarrow{k_2} P$ 是整个反应中最慢的一步, 也就是限制反应速率的步骤。于是 $K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$, k_{-1} 和 K_m 才有共同涵义。

(5) 在没有抑制剂(或仅有非竞争性抑制剂存在时, $E \cdot S$ 分解速率和 $E \cdot S$ 形成速率的比值符合米氏方程, 称为 K_m , 而在另一情况下, K_m 发生变化, 不符合米氏方程, 此时的比值称为表观米氏常数 K_m' 。

(6) 根据预先要求的反应速率, 利用 K_m 和米氏方程可以求出实际应用中需要加入的底物浓度和反应速率。

2. 米氏常数的求法

以酶的 $v-[S]$ 图上可以得到 V_{\max} , 再从 $1/2 V_{\max}$ 可求得相应的 $[S]$, 即 K_m 值, 但实际上不能得到真正的 V_{\max} , 而仅仅是一个近似值, 因此也就不可能准确测定 K_m 值。为了得到准确的 K_m 值, Lineweaver 和 Eadie 等人对米氏方程进行了修改, 使之成为直线方程, 然后用图解法求出准确的 K_m 值。

(1) Lineweaver-Burk 法(双倒数作图法)

Lineweaver-Burk 法是对米氏方程的两边同时取倒数, 即有下面形式:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max} [S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (6-9)$$

然后以 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图, 得到一条直线, 外推至与 x 轴相交, 直线在 -x 轴和 y 轴的截距分别为 $-\frac{1}{K_m}$ 和 $\frac{1}{v_{\max}}$, 直线的斜率为 $\frac{K_m}{v_{\max}}$ 。 $K_m = -\frac{1}{x}$ 此法方便且最常用, 但实验点过分集中在直线的左端, 作图不易十分准确(图 6-5)。

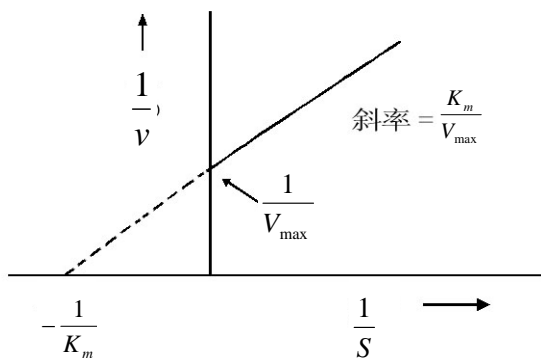


图 6-5 双倒数作图法

3. Eadic-Hofstee 法

Eadic-Hofstee 法又名 $v-v/[S]$ 法, 是将米氏方程改写为:

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + v_{\max}$$

以 v 对 $\frac{v}{[S]}$ 作图, 得到一条直线, 其 y 轴的截距为 v_{\max} , x 轴截距为 $\frac{v_{\max}}{K_m}$, 斜率为 $-K_m$ 。

酶的 K_m 值范围很宽, 一般在 $10^{-6} \sim 10^{-1}$ mol/L 之间, 表 6-4 列出了一些酶的 K_m 。

表 6-4 一些酶的 K_m 值

酶	底物	K_m (mol/L)
过氧化氢酶	H ₂ O ₂	2.5×10^{-2}
转移酶	蔗糖	2.8×10^{-2}
	棉子糖	3.5×10^{-1}
谷氨酸脱氢酶	谷氨酸	1.2×10^{-4}
	α -酮戊二酸	2.0×10^{-3}
	NAD 氧化型	2.5×10^{-5}
	NAD 还原型	1.8×10^{-5}
乳酸脱氢酶	丙酮酸	1.7×10^{-5}
β -半乳糖苷酶	乳糖	4.0×10^{-3}

溶菌酶	6-N-乙酰-葡萄糖胺	6.0×10^{-6}
苏氨酸脱氨酶	苏氨酸	5.0×10^{-3}

二、pH 对酶反应速率影响

大多数酶的活力都受其环境 pH 的影响，每种酶通常在一个较窄的 pH 范围内具有催化活性，在某一特定 pH 时，酶反应具有最大反应速率，高于或低于此值，反应速率下降，通常称此 pH 为酶的最适 pH，一般在 5.5~8.0 之间， v 对 pH 的关系通常呈钟形曲线(图 6-6)。

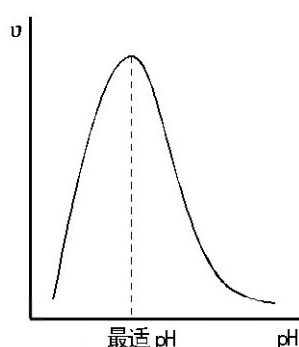


图 6-6 pH 值对酶促反应速率的影响

pH 对酶活力的影响是一个较复杂的问题，底物和辅助因子都会影响酶的最适 pH。因此酶的最适 pH 有时因底物种类、浓度及缓冲液或成分不同而不同。酶分子中的电荷分布，也就是构成酶分子的氨基酸残基侧链的可离解状态，影响酶的催化活性。但必须注意，最适 pH 常与酶的等电点不一致，所以酶的最适 pH 并不是一个常数，只是在一定条件下才有意义。一些酶的最适 pH 值见表 6-5。

表 6-5 一些酶的最适 pH 值

酶	最适 pH	酶	最适 pH
酸性磷酸酯酶(前列腺腺体)	5	葡萄糖氧化酶	5.6
碱性磷酸酯酶(牛乳)	10	α -葡糖苷酶(微生物)	6.6
α -淀粉酶(人唾液)	7	果胶裂解酶(微生物)	9.0~9.2
β -淀粉酶(红薯)	5	果胶酯酶(高等植物)	7
羧肽酶 A(牛)	7.5	黄嘌呤氧化酶(牛乳)	8.3
过氧化氢酶(牛肝)	3~10	脂肪酶(胰脏)	7
纤维素酶(蜗牛)	5	脂肪氧合酶-1(大豆)	9
无花果蛋白酶(无花果)	6.5	脂肪氧合酶-2(大豆)	7

木瓜蛋白酶(木瓜)	7~8	胃蛋白酶(牛)	2
β -呋喃果糖苷酶(土豆)	4.5	胰蛋白酶(牛)	8
		凝乳酶(牛)	3.5
		聚半乳糖醛酸酶(番茄)	4
		多酚氧化酶(桃)	6

pH 影响酶催化活力的原因主要有以下三个方面：

(1) 极端 pH(过高或过低)都将影响蛋白质的构象，甚至使酶变性或失活。

(2) 当 pH 改变不很剧烈时，酶虽然不变性，但是活力受到影响。因为催化活性依赖于酶的质子移变基团(Prototropic group)在酶的活性位点上产生的静电荷数量。而且，底物分子的解离状态(影响程度与底物分子中与酶结合的那些功能基的 pK' 值有关)和酶分子的解离状态也受 pH 的影响。对于一种酶只有一种解离状态，也就是只有最适 pH 能够满足酶的活力中心与底物基团结合，以及催化位点的作用，因此，除此 pH 外，均会降低酶的催化活力。此外，pH 还影响到 E·S 的形成，从而降低酶活性。

(3) pH 影响酶分子中其他基团的解离，因而也影响到酶分子的构象和酶的专一性，同时底物的离子化作用也受 pH 的影响，从而使底物的热力学函数发生变化，结果降低了酶的催化作用。

图 6-7 表明 pH 对几种酶的催化作用的影响，可见酶活力受 pH 的影响很大。因此，酶在提纯和应用中必须保持 pH 恒定，同时应预先确定酶的 pH 稳定范围。

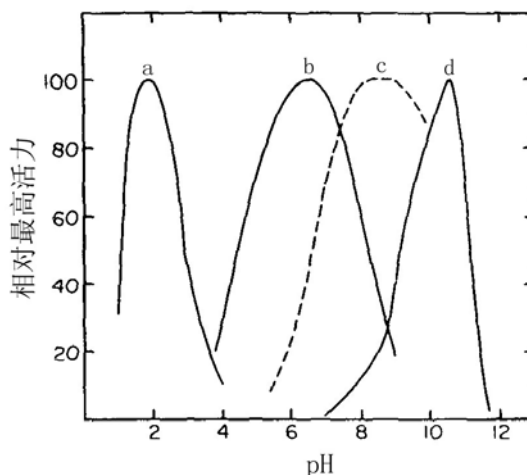


图 6-7 pH 对几种酶的活力影响

- a. 胃蛋白酶作用于 N-乙酰-L-苯丙氨酰-L-二碘酪氨酸；
- b. 过氧化物酶作用于愈创木酚；
- c. 胰凝乳蛋白酶作用于酪蛋白；
- d. 碱性磷酸酯酶作用于对-硝基苯磷酸酯。

通常是测定酶催化反应的初速度和 pH 的关系来确定酶的最适 pH 值。然而在食品加工中酶作用的时间相当长，因此除确定酶的最适 pH 外，还应当考虑酶的 pH 稳定性。

三、温度对酶反应速率的影响

热处理在食品加工和贮藏过程中是一个重要的因素。因为温度改变能够引起食品中各种成分的化学或生物化学变化，而且也会引起酶的作用和微生物发生变化，通过冷藏可以延缓或抑制食品中不利变化和反应；热处理可以促进有利的化学反应或酶反应，也可以通过使酶和微生物失活而阻止不利反应的发生。温度对酶反应速率的影响也是很大的，如图 6-8 所示呈钟形曲线，每一种酶都具有一个最适温度，在最适温度的两侧，反应速率都比较低。一般从温血动物组织中提取的酶，最适温度一般在 35~40℃，植物酶的最适温度稍高，在 40~50℃，从细菌中分离出的某些酶的最适温度可达 70℃，目前人们正在研究和寻找提高酶的耐热性的方法，以扩大酶在食品工业中的应用范围。

温度对酶的反应速率的影响不仅是在 $E \cdot S \xrightarrow{k_2} P$ 这一步，而且还影响酶的稳定性、酶反应中所有的缔合或离解平衡(缓冲溶液的离子化作用、底物、产物和辅助因子的离子化)、酶-底物复合物的缔合或离解、酶的可逆反应 ($S \rightleftharpoons P$)、底物(特别是气体)的溶解性、酶的活性部位和酶-底物复合物的质子移变基团的离子化。

温度对酶催化反应的影响通常从酶对热的稳定性、反应活化能 E_a 和酶活性位点上主要的质子移变基团的化学性质这三个方面进行讨论。

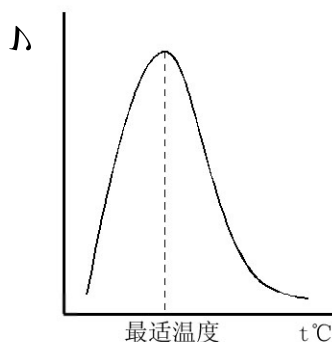


图 6-8 温度与酶反应速率的关系图

温度对酶催化反应速率的影响有双重效应：一方面是当温度升高，反应速率加快，同于一般化学反应。对于许多酶来说，当温度从 22℃ 升高到 32℃ 时，反应速率可提高 2 倍。另一方面，随着温度升高，酶逐渐变性，从而降低酶的催化反应速率。酶最适反应温度是这两种效应平衡的净结果。大部分酶在 60℃ 以上变性，少数酶能耐受较高的温度，如细菌淀粉酶在 93℃ 时活力最高。

同样酶的最适温度不是酶的特征物理常数，而是上述影响的综合结果，它不是一个固定值，而与酶作用的时间长短以及酶和底物的浓度、pH、辅助因子等有关。酶在干燥状态比在潮湿状态对温度的耐受力要高。

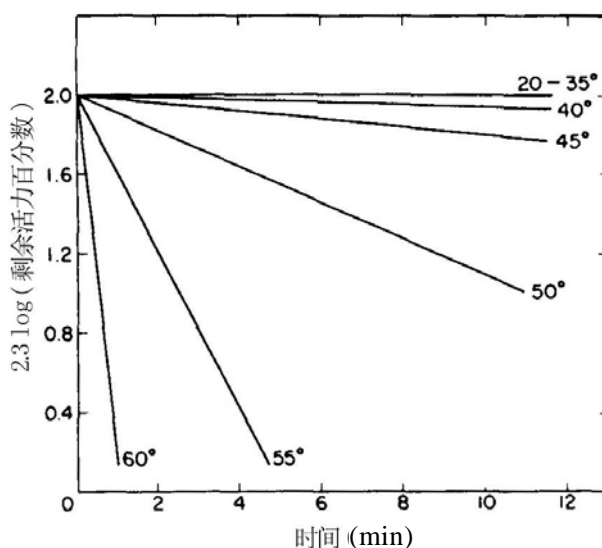


图 6-9 酶在不同温度下的变性速率

酶 ($E_a=60,000\text{Cal}\cdot\text{mol}^{-1}$) 热失活的一级速率常数 k 在温度 40、45、55 和 60℃ 时分别为 0.005、0.020、0.090、0.395 和 1.80min。

酶的热失活通常遵循一级反应动力学(图 6-9)，通过阿伦尼乌斯方程可以得到酶的变性速率常数，从而确定酶的热稳定性。酶热变性的活化能随酶的种类而异，一般在 167~418kJ/mol 范围。于是，当温度升高时，酶变性的速率提高很快。各种酶的热稳定性相差较大，这与酶的结构和本质有关，例如牛奶中的脂酶和碱性磷酸酶是不耐热的，而酸性磷酸酶则相对稳定，土豆中的酶，以过氧化物酶的热稳定性最好，加热不易使之失活。对于那些能引起食品品质下降的酶，在贮藏过程中需进行失活处理，例如半熟的梨中脂肪氧合酶是导致其腐烂的酶，一般仅需加入较少量的漂白剂处理，便能使之失活。在食品保藏中，如果贮存温度低于玻璃化转变温度 T_g 和 T_g' ，则酶的活性完全被抑制。

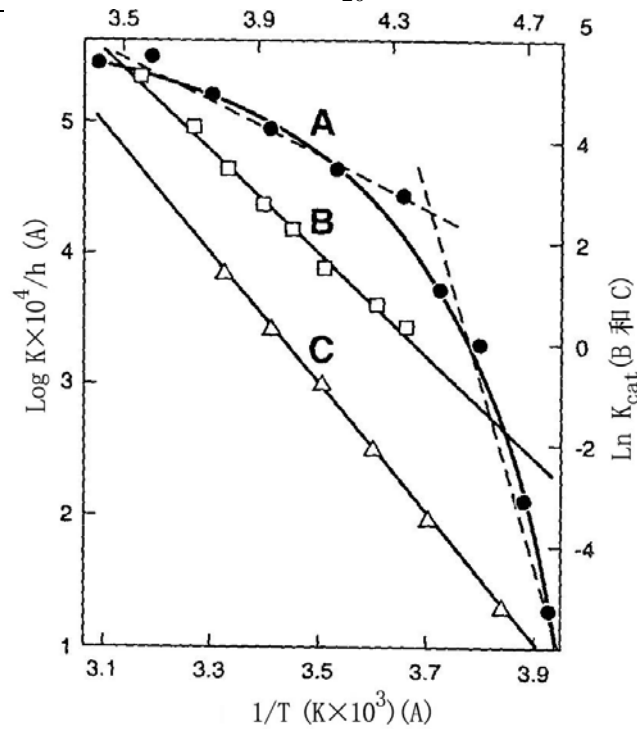


图 6-11 温度(49.6~-60.2℃)对酶催化反应速率的影响

- A. 转化酶催化蔗糖在缓冲溶液中的水解，两条虚线的交点指出了在溶液的冻结点酶催化反应速率的变化出现了转折；
- B. β -半乳糖苷酶催化邻-硝基苯- β -半乳糖苷水解，pH6.1，50%二甲基亚砷-水；
- C. β -半乳糖苷酶催化对-硝基苯- β -半乳糖苷水解，pH7.6，50%二甲基亚砷-水。

在温度低于 0℃，特别是在溶液冷冻干燥时，酶的活性并没有完全停止。其活性差异与酶的类型有关(图 6-10)。从图 6-10(A)可以看出，在温度 49.6~-19.4℃的范围，转化酶催化蔗糖水解，在冻结点反应速率变化出现了转折。而在温度 25~-60.2℃的范围， β -半乳糖苷酶催化邻或对-硝基苯- β -半乳糖苷水解，整个酶活力分别降低 10^5 和 $10^{4.3}$ 倍，但是仍然还具有活性，仅在-3℃时直线的斜率发生变化，同时溶液开始冻结。斜率的变化是由于体系发生相变，改变了限制速率的反应步骤，酶因冷冻浓缩缔合为聚合体或者是底物和水之间的氢键键合增加。如果水解是在 50%二甲基亚砷-水溶液中进行，则直线B和C的斜率没有发生改变，因为体系中没有冰出现，所以此时酶催化反应仍服从阿仑尼乌斯方程。因此，食品应尽量避免在稍低于水的冰点温度保藏，减少因冷冻而引起的酶和底物浓缩造成的酶活力增加。此外，冷冻和解冻能破坏组织结构，从而导致酶与底物更接近，图 6-11 看出鳄鱼组织中的磷脂酶在-4℃的活力相当于-2.5℃的 5 倍。

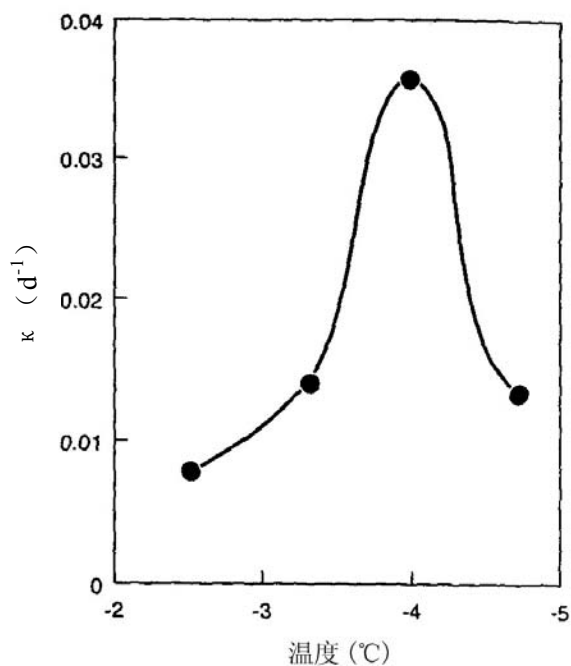


图 6-11 在冰点温度以下鳄鱼肌肉中磷脂酶催化磷脂水解的速率常数 (k)

四、酶浓度对酶反应速率的影响

一般认为在 pH、温度和底物浓度一定时，酶催化反应速率正比于酶的浓度，当 $[S] \gg [E]$ 时，足以使酶饱和，在大多数情况下上述关系是正确的(图 6-12)。这里酶必须是纯酶。

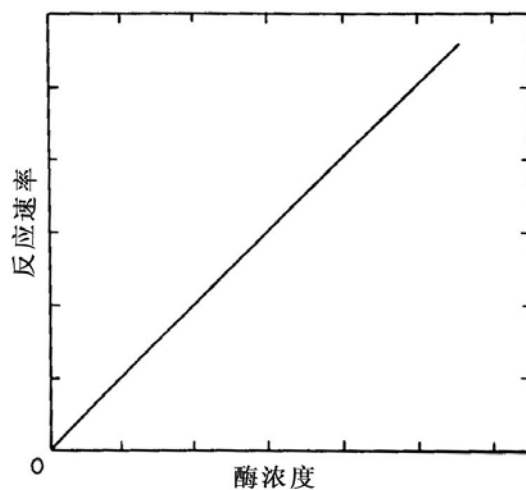


图 6-12 底物浓度、pH、温度和缓冲溶液一定时，酶浓度与反应速率的关系

然而，至少有些例外， $[E]$ 与 v 之间不在线性关系。例如底物溶解度受到限制，底物中存在竞争性抑制剂，底物缓冲剂或水中的不可逆抑制剂如 Hg^{2+} 、

Ag⁺或Pb²⁺等重金属离子，以及溶液中酶主要辅助因子的不溶解等因素，都会造成酶催化反应与米氏方程偏离。

五、水活性对酶活力的影响

酶与蛋白质一样，反应速率受水活性的影响，只有酶的水合作用达到一定程度时才显示出活性。例如溶菌酶的水合作用已由红外光谱和核磁共振谱得到证实，当溶菌酶中蛋白质含水量为 0.2g/g蛋白质时，酶开始显示催化活性，当水合程度达到 0.4g/g蛋白质时，在整个酶分子的表面形成单分子水层，此时酶的活性提高，当含水量为 0.7g/g蛋白质时，溶菌酶活性达到极限，这样才能保证底物分子扩散到酶的活性部位。β-淀粉酶在 a_w 0.8(~2%水含量)以上才显示出水解淀粉的活力，当水活性 a_w 为 0.95(~12%水含量)时，酶的活力提高 15 倍(图 6-13)。从上述例子可以得出如下结论：①食品原料中水分含量低于 1%~2%才能抑制酶的活力；②采用有机溶剂替代部分水的方法，测定酶促反应所需要的含水量，例如，以能与水混溶的甘油替代水，使混合溶剂中水含量为 75%，此时脂肪氧合酶和过氧化物酶的活力减少，当水分含量减少至 20%和 10%时；二者的酶活力降低至 0(6-14 图)，甘油的粘度和特殊效应可能会影响酶的活力；③对于疏水性较强的酶，例如脂肪酶可以用与水不混溶的有机溶剂替代水讨论不同水分含量对酶活力的影响。以脂肪酶催化三丁酯转移至各种醇中为例，将“干”的脂肪酸颗粒(0.48%水含量)，分别悬浮于含水量为 0.3%、0.6%、0.9%和 1.1%(W/W)的正丁醇中，其初始反应速率分别为 0.8、3.5、5 和 4 μmol酯转移/h·100mg脂肪酶。因此，猪胰脂肪酶在 0.9%水分含量时具有最大的催化酯转移速率。

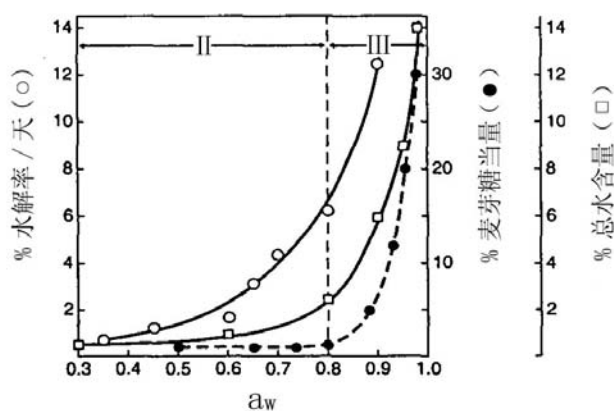


图 6-13 水分活度对酶活力的影响

- 磷酸酯酶催化卵磷脂水解
- β-淀粉酶催化淀粉水解

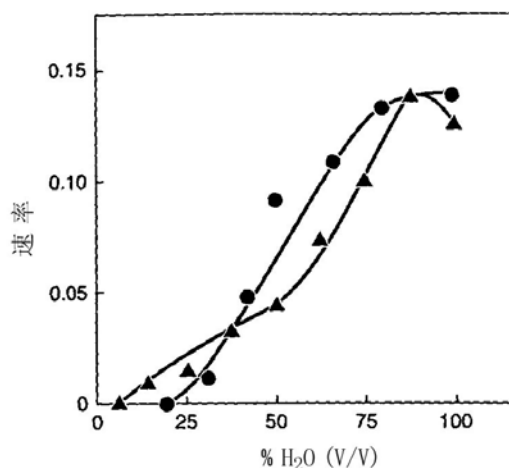


图 6-14 水中甘油含量对过氧化物酶 (▲) 和脂肪氧合酶 (●) 催化反应速率的影响

有机溶剂对酶的催化作用主要影响酶的稳定性和可逆反应进行的方向，亲水和疏水有机溶剂对酶的影响是不相同的。同水不能互溶的有机溶剂，因为溶剂强烈的疏水作用，使酶的专一性发生改变，从催化水解转向催化合成。例如脂肪酶的“干”的颗粒(水分含量约 1%)悬浮于与水不相溶的有机溶剂中时，酶催化酯基转移的速率提高 6 倍以上，而水解速率则降低 16 倍。此外，脂肪酶在有机溶剂中由于构象的变化还能够形成立体专一性。有的酶在有机溶剂中比在水相更稳定，例如核糖核酸酶和溶菌酶，核糖核酸酶在水含量为 6% 时，其热转变温度 (T_m) 为 124℃，在 145℃ 时半衰期为 2.0h。当增加水分含量时稳定性降低，其稀溶液的 T_m 为 61℃，而且酶的半衰期也同时缩短。

Kang 等指出，酶在水-与水混溶的有机溶剂体系中的热稳定性和催化活性，不同于水-与水不混溶的有机溶剂体系中的情形。例如蛋白酶催化酪蛋白水解，在 5%乙醇-95%的缓冲液体系或 5%乙腈-95%缓冲液体系中与仅在缓冲溶液中相比较，均能使 K_m 增加和 V_{max} 减少，以及稳定性降低(通过 CD 和 DSC 分析的结果)。这是质子溶剂如醇和胺，在水解酶反应中的竞争作用所致。

六、激活剂对酶反应速率的影响

凡是能提高酶活性的物质，都称为激活剂。其中大部分是离子和简单有机化合物，激活剂按分子大小分为三类。

(1) 无机离子

金属离子对酶的作用有两方面：一方面是作为酶必不可少的辅助因子；另一方面是它能使很多酶的构象稳定，从而作为激活剂起作用，它们不但影

响底物与酶的结合，同样也影响路易斯酸形成或作为电子载体参与催化反应的过程。

作为激活剂起作用的金属离子有 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 等，其中 Mg^{2+} 是多种激酶与合成酶的激活剂。例如对于催化水解磷酸酯键的酶或者是将ATP的磷酸酯残基转移到适宜受体的酶， Mg^{2+} 通过亲电路易斯酸的方式作用，使底物或被作用物的磷酸酯基上的P-O键极化，以便产生亲核攻击。

激活剂对酶的作用具有一定的选择性，即一种激活剂只能对某些酶起激活作用，而对另一种酶可能有抑制作用，有时离子之间还存在拮抗效应。例如 Na^+ 抑制 K^+ 的激活作用， Mg^{2+} 激活的酶则常为 Ca^{2+} 所抑制。而有的金属离子如 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 可替代 Mg^{2+} 起激活作用。

金属离子浓度对酶的作用有影响，有的激活剂在高浓度时甚至可以从激活剂转为抑制剂。例如 Mg^{2+} 对 $NADP^+$ 合成酶的激活，在浓度为 $5\sim 10\times 10^{-3}mol/L$ 时具有激活作用，但在 $30\times 10^{-3}mol/L$ 时则酶活下降；若用 Mn^{2+} 代规 Mg^{2+} ，则在 $1\times 10^{-3}mol/L$ 起激活作用，高于此浓度，酶活下降，也不再具有激活作用。

此外，阴离子和氢离子也都具有激活作用，但不明显，如 Cl^- 和 Br^- 对动物唾液中的 α -淀粉酶仅显示较弱的激活作用。

(2) 中等大小的有机分子

某些还原剂，如半胱氨酸、还原型谷胱甘肽、氰化物等能激活某些酶，使酶中二硫键还原成硫氢基，从而提高酶活性，如木瓜蛋白酶和D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

金属螯合剂EDTA因能螯合酶中的重金属杂质，从而消除了这些离子对酶的抑制作用。

(3) 具有蛋白质性质的大分子物质能起到酶原激活的作用，使原来无活性的酶原转变为有活性的酶。

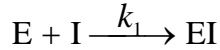
七、抑制剂对酶催化反应速率的影响

酶是蛋白质，因此，凡能使蛋白质变性的任何作用都能使酶失活，例如剪切力、非常高的压力、辐照或是与有机溶剂混溶。同时也可以通过对酶的主活性中心基团修饰而使酶失活。在食品中，所有这些抑制方法都能有效控制酶活性。这种使酶活力丧失的作用称为失活作用。凡使酶活力下降，但并不引起酶蛋白变性的作用称为抑制作用。所以，抑制作用不同于变性作用。实际上在食品中存在一些非竞争性抑制剂，如酚类化合物和芥子油，它们可以非选择性地抑制较宽的酶谱。此外，食品中因环境污染带来的重金属、杀虫剂和其他的化学物质都可成为酶的抑制剂。

从动力学观察考虑，抑制作用可以分为两类，即可逆抑制作用和不可逆的抑制作用。

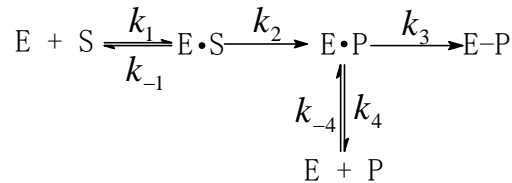
1、不可逆抑制作用

在不可逆抑制作用中，抑制剂通常以非常牢固的以共价键与酶发生共价结合，形成不解离的 EI 复合物，而使酶分子中的一些重要基团发生持久的不可逆变化，从而导致酶失活，不能用透析、超滤等物理方法除去抑制剂而恢复酶活性。



抑制剂对酶的抑制作用依赖于上式的反应速率常数 k_1 、酶的浓度 $[E]$ 和抑制剂的浓度 $[I]$ 。这样，不可逆抑制作用就成为反应时间的函数。

有时酶的活性位点是与某些化合物结合，生成一中间产物 P，然后该中间产物与酶作用形成共价化合物 E-P，从而使酶不可逆失活。



当上式中 $k_3 > k_4$ 时酶迅速失活，这里将底物称为抑制剂，或者实际上 S 不是底物。它们在医药上具有很高的价值，食品中控制酶活也是非常有用的。

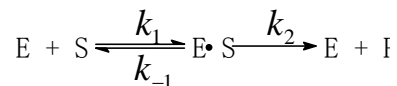
另外的一类不可逆抑制剂是与酶的氨基酸侧链上的一些基团，例如巯基、氨基、羧基和咪唑基等结合，通常将这类反应称为蛋白质修饰，如 -SH 与碘乙酸的反应。

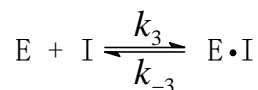
2、可逆的抑制作用

可逆的抑制作用是指抑制剂与酶蛋白的结合是可逆的，可采用透析或胶凝法除去抑制剂，恢复酶的活性。在可逆抑制剂与游离状态的酶之间仅在几 msec 内就能建立一个动态平衡，因此可逆抑制反应非常迅速。可逆的抑制作用也可以采用动力学方法处理。通常将可逆抑制分为竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制三种类型。异位抑制和其他类型的可逆性抑制将不在本书中阐述。

(1) 竞争性抑制 (Competitive inhibition)

抑制剂与游离酶的活性位点结合，从而阻止底物与酶的结合，所以底物与抑制剂之间存在竞争反应。假设 $[I]_0 \gg [E]_0$ ，这样 $[I] \cong [I]_0$ 。





根据单底物反应的稳定态理论，得到一个派生的米氏方程。

$$v_0' = \frac{V_{\max} [S]_0}{(1 + \frac{[I]_0}{K_i}) K_m + [S]_0}$$

这是 v_0' ，在抑制剂浓度一定时的初始抑制速率。 K_i 为酶-抑制剂复合物的解离常数或抑制常数，是一个衡量抑制程度的标准。 K_i 愈小，抑制剂与酶的亲和力愈强。

如果上式按 Lineweaver-Burk 方程改写，则为：

$$\frac{1}{v_0'} = (1 + \frac{[I]_0}{K_i}) \frac{K_m}{v_{\max} [S]_0} + \frac{1}{v_{\max}}$$

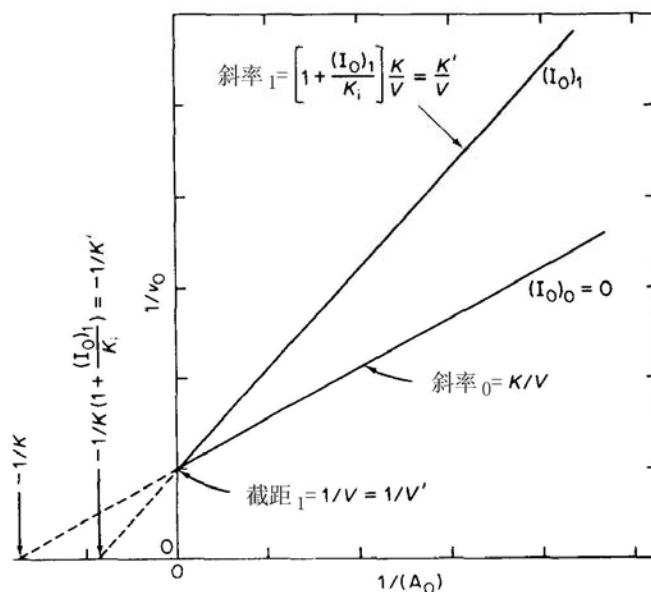


图 6-15 Lineweaver-Burk 方程的竞争性抑制剂对酶催化反应动力学的影响

$$v = V_{\max}; [I_0]_1 = K_i; [A]_0 \text{ 为初始底物浓度}$$

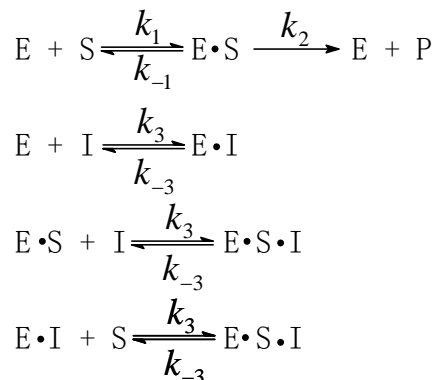
抑制剂存在与不存在时的线性关系见图 6-13，由图可见，y轴截距无论是存在或不存在竞争性抑制剂，都是相同的，且 V_{\max} 不受影响。当底物浓度很高时，抑制剂可从活性位点驱除，也就是说可以消除抑制作用的影响。而且在有抑制剂存在时的直线斜率 $(1 + \frac{[I]_0}{K_i})$ 大于没有抑制剂的情况，也就是 K_m 变大。

在许多情况下，竞争性抑制剂具有与底物相类似的结构，与酶形成可逆的EI

复合物，但EI不能离解成产物P，因此酶反应速率下降。最典型的例子是丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制，因为丙二酸是二羧酸化合物，与酶的正常底物琥珀酸结构很相似。

(2) 非竞争性抑制 (noncompetitive inhibition)

非竞争性抑制剂不与酶的活性位点结合，而是与酶的其他部位相结合。这样抑制剂就可以同等的与游离酶，或与酶-底物反应。因此，以下过程可以同时平行进行：



这里 k_{-1}/k_1 是解离常数，是相对于 $E \cdot S$ 和 $E \cdot S \cdot I$ 的形成速率常数 K_s ， k_{-3}/k_3 解离常数是相对于 $E \cdot I$ 和 $E \cdot S \cdot I$ 的形成常数 K_i 而言，假设在 $E \cdot S \cdot I$ 和 $E \cdot I$ 状态下，酶没有活性，且解离常数 K_i 和 K_{ESI} 在数字上相同，这样即可以得到简单的线性非竞争性抑制底物反应方程

$$v_0' = \frac{V_{\max} [S]_0}{[1 + \frac{[I]_0}{K_i}](K_m + [S]_0)}$$

和相应的 lineweaver-Burk 方程。

$$\frac{1}{v_0'} = (1 + \frac{[I]_0}{K_i}) (\frac{K_m}{V_{\max} [S]_0} + \frac{1}{V_{\max}})$$

酶的恒定方程为

$$[E]_0 = [E] + [E \cdot S] + [E \cdot I] + [E \cdot S \cdot I]$$

双倒数直线 (图 6-16) 表明，在非竞争性抑制存在时，对酶催化反应的 K_m 没有影响，而简单的非竞争性抑制作用直线的斜率和在 y 轴上的截距都增加，即 V_{\max} 减小为 $\frac{1}{1 + \frac{[I]_0}{K_i}}$ 。由此可知，增加底物浓度不能消除抑制剂的影响。这

也意味着，非竞争性抑制剂降低了酶的催化反应效果。

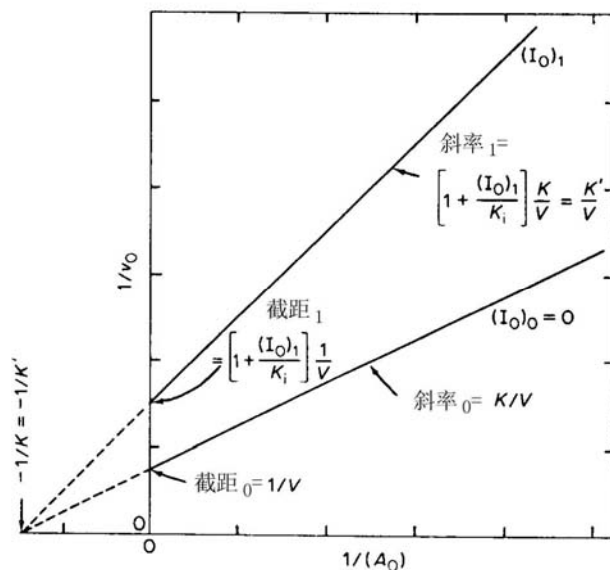


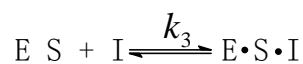
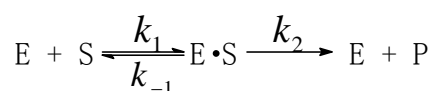
图 6-16 简单的非竞争性线性抑制作用图

$v = V_{\max}$; $[I_0]_1 = K_i$; $[A]_0$ 为初始底物浓度

非竞争性抑制剂一般是具有能结合酶中-SH基的基团，而这种-SH基对于酶活性来说也是很重要的，因为它们有助于维持和稳定酶分子的构象。这类试剂是含有 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ 等金属离子的化合物，此外，EDTA结合酶中的金属离子引起的抑制，也属于非竞争性抑制。

3、反竞争性抑制 (uncompetitive inhibition)

反竞争性抑制作用不像竞争性抑制和非竞争性抑制反应，抑制剂不能直接与游离酶结合，仅能与酶-底物复合物反应，形成一个或多个中间复合物。



这里 $E \cdot S \cdot I$ 不能从底物形成产物 P，根据米氏方程，反应速率为

$$v_0' = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0 (1 + \frac{[I]_0}{K_i})}$$

相对于 Lineweaver-Burk 方程和恒定方程为

$$\frac{1}{v_0'} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]_0} + \frac{1 + [I]_0 / K_i}{V_{\max}}$$

$$[E]_0 = [E] + [E \cdot S] + [E \cdot S \cdot I]$$

由双倒数法作图(图 6-17)可知,在反竞争性抑制剂存在时,最大速率 V_{\max} 和 K_m 均减小,而 $\frac{K_m}{v_{\max}}$ 的比值不变,所以直线的斜率与没有抑制剂时相等。

反竞争性抑制作用,在单底物存在的情况下相当罕见,而以双底物催化反应中发生较多。

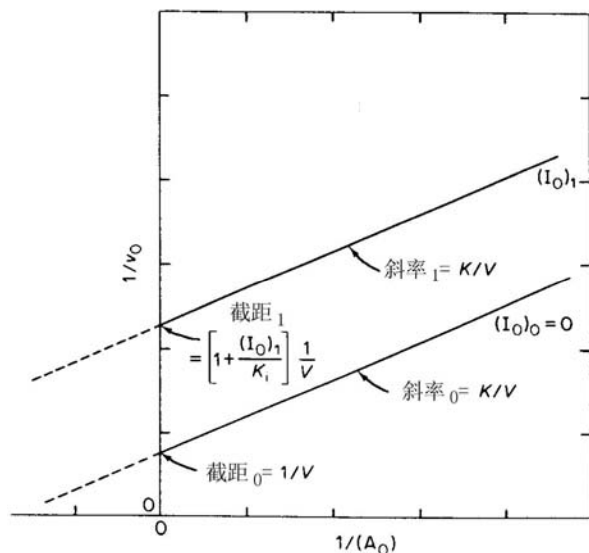


图 6-17 线性反竞争抑制作用图

$v = V_{\max}$; $[I_0]_1 = 2 K_i$; $[A]_0$ 为初始底物浓度

无抑制剂和有抑制剂存在的各种情况下,酶催化的最大反应速率 V_{\max} 和 K_m 值见表 6-6 所示。

表 6-6 有无抑制剂存在时酶催化反应的 V_{\max} 和 K_m 值

类型	公式	V_{\max}	K_m
无抑制剂	$v_0 = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$	V_{\max}	K_m
竞争性抑制	$v_0' = \frac{V_{\max} [S]_0}{(1 + \frac{[I]_0}{K_i}) K_m + [S]_0}$	不变	增加
非竞争性抑制	$v_0' = \frac{V_{\max} [S]_0}{(1 + \frac{[I]_0}{K_i})(K_m + [S]_0)}$	减小	不变
反竞争性抑制	$v_0' = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0(1 + \frac{[I]_0}{K_i})}$	减小	减小

注:在正常情况下非竞争性抑制剂存在时, K_m 为米氏常数;竞争性抑制剂和别构

酶存在时， K_m' 为表观米氏常数。

第三节 酶在食品中的作用

酶对于食品的质量有着非常重要的作用。实际上，没有酶就没有生命，也就没有食品。食物的生长和成熟过程无不与酶活性相关，而且，甚至有时生长的环境条件也影响包括酶在内的食物的组成成分。Bray 报道了植物在生长和成熟期间，由于水分缺乏会影响到基因的表达。

成熟之后的采收、保藏和加工条件都将显著影响食品变化的速度，从而影响食品的品质。由酶催化的反应，有的是需氧的，有的则是不需氧的。因此，控制这些酶的活力则有利于提高食品的质量和延长货架期。

在食品加工中添加外源酶以改善食品的特性和用于许多产品的生产。早在古代，人们便开始不知不觉的在食品加工过程中采用酶催化反应，这些酶可能是存在于食品中的内源酶，也可能来自微生物。目前已有几十种酶成功地在食品工业，例如，葡萄糖、饴糖、果葡糖浆的生产、蛋白质制品加工、果蔬加工、食品保鲜以及改善食品的品质和风味等方面得到应用。

一、内源酶在食品质量中的作用

1、颜色

食品的颜色是众多消费者首先关注的感官指标和是否接受的标准。任何食品，无论是新鲜的还是经过加工的，都具有代表自身特色和本质的色泽，多种原因乃至环境条件的改变，即可导致颜色的变化，其中酶是一个敏感的因素。众所周知新鲜的瘦肉应该是红色，而不是紫色或褐色。因为红色是肌肉的主要色素，仅来自氧合肌红蛋白。只有当氧合肌红蛋白发生氧化还原反应或其他反应，才能改变肉的颜色，如肌肉中的酶催化竞争氧的反应，使之改变了氧合肌红蛋白的氧化-还原状态和水分含量，从而使肉的颜色由原来的红色转变为脱氧肌红蛋白的紫色和高铁血红蛋白的褐色。莲藕由白色变为粉红色后，其品质下降，这是由于莲藕中的多酚氧化酶和过氧化物酶催化氧化了莲藕中的多酚类物质的结果。

绿色常常作为人们判断许多新鲜蔬菜和水果质量标准的基础，在成熟时，水果的绿色减退而代之以红色、橙色、黄色和黑色。青刀豆和其他一些绿叶蔬菜，随着成熟度增加导致叶绿素含量降低。以上所述的颜色变化都与食品中的内源酶有关，其中最主要的是脂肪氧合酶(Lipoxygenase)、叶绿素酶(Chlorophyllase)和多酚氧化酶(Polyphenol oxidase)。

(1) 脂肪氧合酶

脂肪氧合酶(亚油酸酯:氧 氧化还原酶, EC 1.13.11.2)对于食品有 6 个方面的影响, 其中有的是需宜的, 有的则是不需宜的。两个有益的功能是用于小麦粉和大豆粉的漂白; 制作面团时在面筋中形成二硫键。然而, 脂肪氧合酶对亚油酸酯的催化氧化则可能产生一些负面影响, 破坏叶绿素和胡萝卜素, 从而使色素降解而发生褪色; 或者产生具有青草味的不良异味; 破坏食品中的维生素和蛋白质类化合物; 食品中的必需脂肪酸, 例如亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸遭受氧化性破坏。

脂肪氧合酶的上述所有反应结果, 都是来自酶对不饱和脂肪酸(包括游离的或结合的)的直接氧化作用, 形成自由基中间产物, 其反应历程如图 6-18 所示。在反应的第 1、2 和 3 步包括活泼氢脱氢形成顺, 顺-烷基自由基、双键转移, 以及氧化生成反, 顺-烷基自由基与烷过氧自由基; 第 4 步是形成氢氧化物。然后, 进一步发生非酶反应导致醛类(包括丙二醛)和其他不良异味化合物的生成。自由基和氢过氧化物会引起叶绿素和胡萝卜素等色素的损失、多酚类氧化物的氧化聚合产生色素沉淀, 以及维生素和蛋白质的破坏。食品中存在的一些氧化剂如 V_E 、没食子酸丙酯、去甲二氢愈创木酸等能有效阻止自由基和氢过氧化物引起的食品损伤。

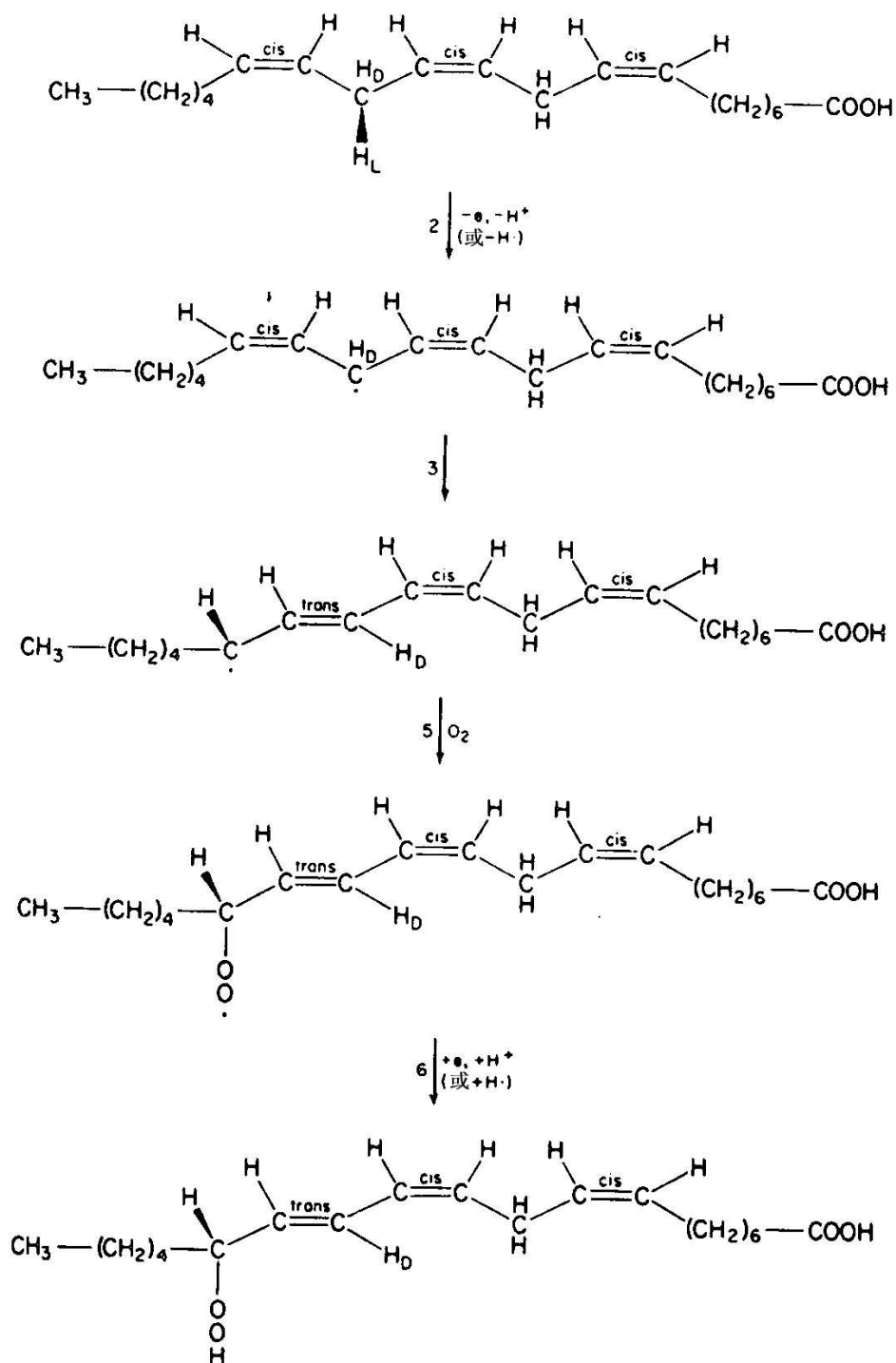


图 6-18 脂肪氧合酶的催化反应历程

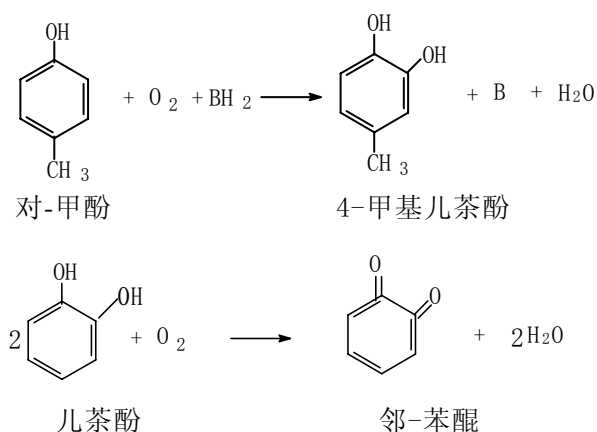
(2) 叶绿素酶

叶绿素酶（叶绿素 脱植基叶绿素-水解酶，EC 3.1.1.14）存在于植物和含有叶绿素的微生物中，水解叶绿素生成植醇和脱植基叶绿素。尽管将此反应归之于植物绿色的损失，然而还没有足够证据说明，脱植基叶绿素仍然具有绿色。因此，无根据说明脱植基叶绿素脱色（即失去 Mg^{2+} ）的稳定性低于叶绿

素。叶绿素酶在植物体内的作用至今仍然还是不清楚。关于叶绿素酶在植物食品原料保藏期中对于叶绿素的催化水解很少有研究涉足。

(3) 多酚氧化酶

多酚氧化酶 (1, 2-苯二酚:氧 氧化还原酶, EC 1. 10. 3. 1) 通常又称为酪氨酸酶(Tyrosinase)、多酚酶(Polyphenolase)、酚酶(phenolase)、儿茶酚氧化酶(Catechol oxidase)、甲酚酶(Cresolase)或儿茶酚酶(Catecholase), 这些名称的使用是由测定酶活力时使用的底物, 以及酶在植物中的最高浓度所决定。多酚氧化酶存在于植物、动物和一些微生物(特别是霉菌)中, 它催化两类完全不同的反应。



这两类反应一类是羟基化, 另一类是氧化反应。前者可以在多酚氧化酶的作用下氧化形成不稳定的邻-苯醌类化合物, 然后再进一步通过非酶催化的氧化反应, 聚合成为黑色素(melanin), 并导致香蕉、苹果、桃、马铃薯、蘑菇、虾发生非需宜的褐变和人的黑斑形成。然而对茶叶、咖啡、葡萄干和梅干, 以及人的皮肤色素形成产生需宜的褐变。当邻苯醌与蛋白质中赖氨酸残基的 ϵ -氨基反应, 可引起蛋白质的营养价值和溶解度下降, 同样由于褐变反应也将会造成食品的质地和风味的变化。

据估计, 热带水果 50%以上的损失都是由于酶促褐变引起的。同时酶促褐变也是造成新鲜蔬菜例如莴苣和果汁的颜色变化、营养和口感变劣的主要原因。因此, 科学工作者提出了许多控制果蔬加工和贮藏过程中酶促褐变的方法, 例如驱除 O_2 和底物酚类化合物以防止褐变, 或者添加抗坏血酸、亚硫酸氢钠和硫醇类化合物等, 将初始产物、邻苯醌还原为原来的底物, 从而阻止黑色素的生成。另一方面, 这些还原剂都能直接引起酶失活, 从而抑制酶促褐变。这是因为抗坏血酸能够破坏酶活性位点上的组氨酸残基, 而亚硫酸氢钠和硫醇可以除去酶活性位点中的 Cu^{2+} 。然而实际上这些方法都不是行之有效的措施。

4-己基间苯二酚、苯甲酸和其他一些非底物酚类化合物, 也可作为多酚

氧化酶的有效竞争性抑制剂，其 K_i 一般在 $1\sim 10\ \mu\text{mol/L}$ 之间。

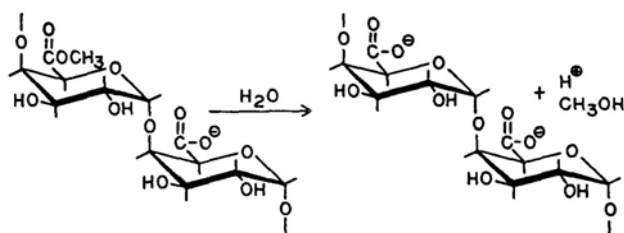
二、质地

质地对于食品的质量是一项至关重要的指标，水果和蔬菜的质地主要与复杂的碳水化合物有关，例如果胶物质、纤维素、半纤维素、淀粉和木质素。然而影响各种碳水化合物结构的酶可能是一种或多种，它们对食品的质地起着重要的作用。如水果后熟变甜和变软，是酶催化降解的结果。蛋白酶的作用可使动物和高蛋白植物食品的质地变软。

1、果胶酶

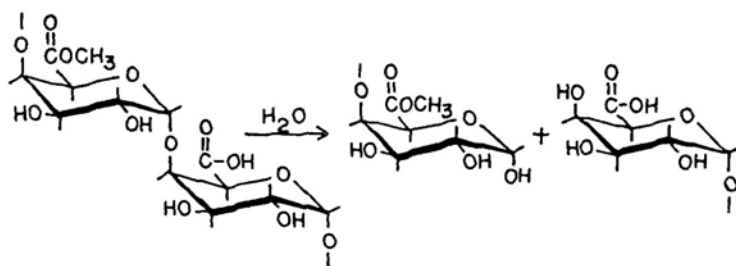
果胶酶 (pectic enzymes) 有 3 种类型，它们作用于果胶物质都产生需宜的反应。其中果胶甲酯酶 (pectin methylesterase) 和聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase) 存在于高等植物和微生物中，而果胶酸裂解酶 (pectate lyases) 仅在微生物中发现。

果胶甲酯酶(果胶 果胶基水解酶，EC 3.1.1.11) 水解果胶的甲酯键，生成果胶酸和甲醇。



果胶甲酯酶又称为果胶酯酶 (Pectinesterase)、果胶酶 (Pectase)、脱甲氧基果胶酶 (Pectin demethoxylase)。当有二价金属离子，例如 Ca^{2+} 存在时，果胶甲酯酶水解果胶物质生成果胶酸，由于 Ca^{2+} 与果胶酸的羧基发生交联，从而提高了食品的质地强度。

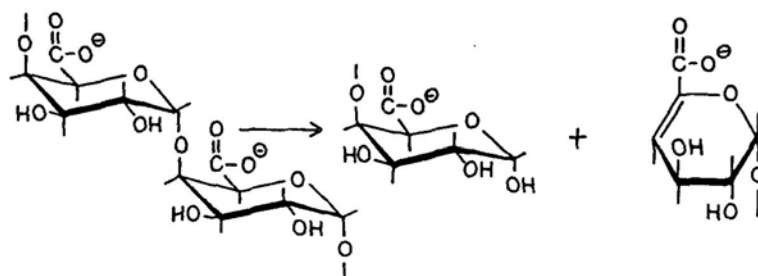
聚半乳糖醛酸酶(聚- α -1,4-半乳糖醛酸苷 聚糖-水解酶，EC 3.2.1.15) 水解果胶物质分子中脱水半乳糖醛酸单位的 α -1,4-糖苷键。



聚半乳糖醛酸酶有内切和外切酶两种类型存在，外切型是从聚合物的末端糖苷键开始水解，而内切型是作用于分子内部。由于植物中的果胶甲酯酶

能迅速裂解果胶物质为果胶酸，因此关于植物中是否同时存在聚半乳糖醛酸酶(作用于果胶酸)和聚甲基半乳糖醛酸酶(作用于果胶)，目前仍然有着不同的观点。聚半乳糖醛酸酶水解果胶酸，将引起某些食品原料物质(如番茄)的质地变软。

果胶酸裂解酶[聚-(1,4- α -D-半乳糖醛酸苷)裂解酶，EC 4.2.2.2]在无水条件下能裂解果胶和果胶酸之间的糖苷键，其反应机制遵从 β -消去反应。它们存在于微生物中，而在高等植物中没有发现。 H_2O



由上述反应式可见，果胶裂解酶裂解糖苷键后生成一个含还原基的产物和另一个含双键的产物，其中前一个产物与聚半乳糖醛酸酶作用于果胶生成含还原基的产物相同，同时二者都能降低食品质地强度，因此，不可能用这种方法区别它们。然而，果胶裂解酶因生成的第二个产物含有双键，在235nm波长的摩尔消光系数为 $4.80 \times 10^3 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。因此，可以根据反应体系在235nm处的吸光度变化区别果胶裂解酶和聚半乳糖醛酸酶。果胶裂解酶也包括内切酶和外切酶两种类型。同样也可以根据作用底物的专一性将果胶裂解酶分为两种类型，即作用于果胶或果胶酸的果胶裂解酶。

原果胶酶(Protopectinase)是第4种类型的果胶降解酶，仅存在于少数几种微生物中。原果胶酶水解原果胶生成果胶。然而，植物中原果胶酶的活力是来源于果胶甲酯酶和聚半乳糖醛酸酶二者共同作用的结果，是否是真实的原果胶酶作用，这一问题仍然还不清楚。

2、纤维素酶和戊聚糖酶

众所周知，树和棉花中富含纤维素，而水果、蔬菜中含量却很少。纤维素在细胞结构中起着重要的作用。关于纤维素酶(cellulases)在豆类变软中的作用尚无定论。但是在果蔬汁加工中却常利用纤维素酶改善其品质。关于微生物纤维素酶的研究报道较多，主要在于它能够将纤维素转化为可溶性葡萄糖的潜在能力。半纤维素存在于高等植物中，它是木糖、阿拉伯糖或木糖与阿拉伯糖以及少量其他戊糖和己糖聚合而成的聚合物。

戊聚糖酶(Pentosanases)存在于微生物和一些高等植物中，能够水解木聚糖、阿拉伯聚糖和木糖与阿拉伯糖的聚合物为小分子化合物。在小麦中存

在少数浓度很低的内切和外切水解戊聚糖酶，然而对它们的特性了解较少。

3、淀粉酶

淀粉酶(Amylases)不仅存在于动物中，而且也存在于高等植物和微生物中，能够水解淀粉。因此，食品在成熟、保藏和加工过程中淀粉被降解也就不足为奇了。淀粉在食品中主要提供粘度和质地，如果在食品的贮藏和加工中淀粉被淀粉酶水解，将显著影响食品的品质。淀粉酶包括 α -淀粉酶， β -淀粉酶和葡糖淀粉酶三种主要类型，此外还有一些降解酶。表 6-7 列出了某些降解酶。

α -淀粉酶存在于所有的生物体中，能水解淀粉(直链淀粉和支链淀粉)、糖原和环状糊精分子内的 α -1,4-糖苷键，水解物中异头碳的 α -构型保持不变。由于水解是在分子的内部进行，因此 α -淀粉酶对食品的主要影响是降低粘度，同时也影响其稳定性，例如布丁、奶油沙司等。唾液和胰 α -淀粉酶对于食品中淀粉的消化吸收是很重要的，一些微生物中含有较高水平的 α -淀粉酶，它们具有较好的耐热性。

β -淀粉酶从淀粉的非还原末端水解 α -1,4 糖苷键，生成 β -麦芽糖。因为 β -淀粉酶是外切酶，只有淀粉中的许多糖苷键被水解，才能观察到粘度降低。它主要存在于高等植物中，它不能水解支链淀粉的 α -1,6-糖苷键，但能够完全水解直链淀粉为 β -麦芽糖。因此，支链淀粉仅能被 β -淀粉酶有限水解。麦芽糖浆聚合度大约为 10，在食品工业中，应用十分广泛，麦芽糖可以迅速被酵母麦芽糖酶裂解为葡萄糖，因此， β -淀粉酶和 α -淀粉酶在酿造工业中非常重要。 β -淀粉酶是一种巯基酶，它能被许多巯基试剂抑制。在麦芽中， β -淀粉酶可以通过二硫键与另外的巯基以共价键连接，因此，淀粉用巯基化合物处理，例如半胱氨酸，可以增加麦芽中 β -淀粉酶的活性。

葡糖淀粉酶又名葡糖糖化酶，是从淀粉的非还原末端水解 α -1,4 键生成葡萄糖，其中对支链淀粉中的 α -1,6 键的水解速率比水解直链淀粉的 α -1,4 键慢 30 倍，糖化酶在食品和酿造工业上有着广泛的用途，例如果葡糖浆的生产。

表 6-7 一些淀粉和糖原降解的酶

名称	作用的糖苷键	说明
内切酶(保持构象不变)		
α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)	α -1,4	反应初期产物主要是糊精；终产物是麦芽糖和麦芽三糖
异淀粉酶(EC 3.2.1.68)	α -1,6	产物是线性糊精
异麦芽糖酶(EC 3.2.1.10)	α -1,6	作用于 α -淀粉酶水解支链淀粉的产物

环状麦芽糊精酶 (EC 3.2.1.54)	α -1,4	作用于环状或线性糊精，生成麦芽糖和麦芽三糖
支链淀粉酶 (EC 3.2.1.41)	α -1,6	作用于支链淀粉、生成麦芽三糖和线性糊精
异支链淀粉酶 (EC 3.2.1.57)	α -1,4	作用于支链淀粉生成异潘糖，作用于淀粉生成麦芽糖
新支链淀粉酶	α -1,4	作用于支链淀粉生成异潘糖，作用于淀粉生成麦芽糖
淀粉支链淀粉酶	α -1,4 α -1,6	作用于支链淀粉生成麦芽三糖，作用于淀粉生成聚合度分为 2~4 的产物。
外切酶(非还原端)		
β -淀粉酶 (EC 3.2.1.2)	α -1,4	产物为 β -麦芽糖
α -淀粉酶	α -1,4	产物为 α -麦芽糖，对于专一外切 α -淀粉酶的产物是麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖和麦芽六糖，并保持构象不变。
葡糖糖化酶 (EC 3.2.1.3)	α -1,6	产物为 β -葡萄糖
α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20)	α -1,4	产物是 α -葡萄糖
转移酶		
环状麦芽糊精葡萄糖转移酶 (EC 2.4.1.19)	α -1,4	由淀粉生成含 6~12 个糖基单位的 α -和 β -环状糊精

4、蛋白酶

蛋白酶在食品生产中，不仅用于提高食品的质地和风味，而且也常用于肉制品和乳制品的加工，例如利用凝乳酶形成酪蛋白凝胶制造干酪。这些酶可以从动物、植物或微生物中分离得到。当明胶中加入菠萝，由于存在于菠萝中的菠萝蛋白酶的作用使之不能形成凝胶，而凝乳酶能够水解 κ -酪蛋白中的 Phe₁₀₅-Met₁₀₆ 单个肽键，使牛乳形成凝胶， κ -酪蛋白的专一性水解使酪蛋白胶束失稳，并引起聚集和形成凝乳(农家干酪)。有时也添加微生物酶改善干酪的风味。在焙烤食品加工中，将蛋白酶作用于小麦面团的谷蛋白，不仅可以提高混合特性和需要的能量，而且还能改善面包的质量。蛋白酶另外一个显著的作用是在肉类和鱼类加工中分解结缔组织中的胶原蛋白、水解胶原、促进嫩化。动物屠宰后，肌肉将变得僵硬(肌球蛋白和肌动蛋白相互作用引起伸展的结果)，在贮存时(7~21d)，通过内源酶(Ca²⁺-激活蛋白酶，或许是组织蛋白酶)作用于肌球蛋白-肌动蛋白复合体，肌肉将变得多汁。添加外源酶，

例如木瓜蛋白酶和无花果蛋白酶，由于他们的选择性较低，主要是水解弹性蛋白和胶原蛋白，从而使之嫩化。组织蛋白酶存在于动物组织细胞的溶菌体内，在酸性pH具有活性，当动物宰后其pH下降，这些酶释放出来，可能导致肌肉细胞中的肌原纤维及胞外结缔组织分解。

啤酒中的沉淀与蛋白质沉降有关，可以通过加入植物蛋白酶水解消除。特别应该强调的是，利用酶水解蛋白质应该尽量避免产生苦味肽或氨基酸。

三、风味

对食品中风味和异味有贡献的化合物不计其数，然而评价这些化合物的结合却不是一件容易的事情。鉴定酶在产生食品风味的生物合成途径和形成不需宜风味的历程，同样也是相当困难的，许多风味物质的形成都与多种酶的作用途径有关。食品在加工和贮藏过程中酶还可以改变食品的风味或增色，特别是风味酶的发现和应用，使之更能真实的让风味再现、强化和改变。例如，将奶油风味酶作用于含乳脂的巧克力、冰淇淋、人造奶油等食品，可增强这些食品的奶油风味。

食品在加工和贮藏过程中，由于酶的作用可能使原有的风味减弱或失去，甚至产生异味。例如不恰当的热烫处理或冷冻干燥，由于过氧化物酶、脂肪氧合酶等的作用，会导致青刀豆、玉米、莲藕、冬季花菜和花椰菜等产生明显的不良风味。即使经热处理后的过氧化物酶，当在常温下保存，酶活力仍能部分恢复。过氧化物酶的再生是它又一个重要特征，这一点对于新鲜水果和蔬菜贮藏是特别值得注意的。过氧化物酶是一种非常耐热的酶，广泛存在于所有高等植物中，其中对辣根的过氧化物酶研究最为清楚。通常将过氧化物酶作为一种控制食品热处理的温度指示剂，同样也可以根据酶作用产生的异味物质作为衡量酶活力的灵敏方法。过氧化物酶从风味、颜色和营养的观点看似乎也是重要的，例如，过氧化物酶能导致维生素 C 的氧化降解。当不饱和脂肪酸不存时，它能催化胡萝卜素和花色苷失去颜色，过氧化物酶还能促进不饱和脂肪酸的过氧化物降解，产生挥发性的氧化风味化合物。此外，过氧化物酶在催化过氧化物分解的历程中，同时产生了自由基，已经知道，反应中产生的自由基能引起食品许多组分的破坏。因此，关于酶催化氧化风味的形成和其他异味的产生，过氧化物酶与脂肪氧合酶的影响机制仍不十分清楚。但有一点可以肯定，二者对氧化风味均有贡献，有时往往是共同作用的结果。除此之外，未经热烫的冷藏蔬菜所产生的异味，不仅与过氧化物酶和脂肪氧合酶有关，而且还与过氧化氢酶、 α -氧化酶（ α -oxidase）和十六烷酰-辅酶 A 脱氢酶有关。

Whitaker 和 Pangborn 等人研究认为,青刀豆和玉米产生不良风味和异味主要是脂肪氧合酶催化氧化的作用,而冬季花椰菜却主要是在半胱氨酸裂解酶的作用下形成不良风味。然而,另外的研究表明,尽管过氧化物酶还不是完全决定食品产生异味的酶,但是,它以较高的水平在自然界存在,优良的耐热性能,使之仍能作为判断一种冷冻食品风味稳定性和果蔬热处理是否充分的一项指标。

柚皮苷是葡萄柚和葡萄柚汁产生苦味的物质,可以利用柚皮苷酶处理葡萄柚汁,破坏柚皮苷从而脱除苦味,也有采用 DNA 技术去除柚皮苷生物合成的途径达到改善葡萄柚和葡萄柚汁口感的目的。

四、营养质量

酶对食品营养影响的研究相对报道较少。已知脂肪氧合酶氧化不饱和脂肪酸,会引起亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸这些必需脂肪酸含量降低,同时产生过氧自由基和氧自由基,这些自由基将使食品中的类胡萝卜素(维生素 A 的前体物质)、生育酚(维生素 E)、维生素 C 和叶酸含量减少,破坏蛋白质中的半胱氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸残基,或者引起蛋白质交联。一些蔬菜(如西葫芦)中的抗坏血酸能够被抗坏血酸酶破坏。硫胺素酶会破坏氨基酸代谢中必需的辅助因子硫胺素。此外,存在于一些微生物中的核黄素水解酶能降解核黄素。多酚氧化酶不仅引起褐变,使食品产生不需宜的颜色和味道,而且还会降低蛋白质中的赖氨酸含量,造成营养价值损失。

第四节 食品加工中的固定化酶

酶的固定化是 20 世纪 50 年代发展起来的一项技术,人们基于生物体内的酶固定在细胞壁和膜的现象,提出酶的固定化,希望酶能重复使用,同时又能稳定酶、改变酶的专一性、提高酶活力,从而改善酶的各种特性。前面已经提到,食物中的内源酶或添加的外源酶,能够改变食品的色泽、风味、质地和营养,乃至影响加工过程和食品的货架期。因此,食品加工中酶的应用愈来愈广泛。

所谓固定化酶(immobilized enzyme),是指在一定空间内呈闭锁状态存在的酶,能连续地进行反应,反应后的酶可以回收重复使用。根据 1971 年第一届国际酶工程会议对酶的分类,酶可分为天然和修饰酶,固定化酶属于修饰酶。

在食品加工中固定化酶的使用显得尤为重要。食品是一个相当复杂的物

理体系，而不是一个复杂的化学问题。由于酶的高度专一性，只能作用于特定底物，例如葡萄糖，因此，葡糖氧化酶能从这复杂的混合物中选择性地与葡萄糖反应，生成共价化合物。然而数以百计的化合物则不发生变化。在固定化酶体系中，特定的排列对于酶与底物结合是必需的，这就可能制备固定化酶和循环使用。固定化酶在食品分析中也有着特别的价值。

酶的固定化，可以通过将酶包裹于聚合基质或连接于载体分子而限制酶的移动；也可以采用酶的交联，通过蛋白质交联或无活性材料的加入，从而产生无数不同材料的固定方法；连接于合成材料载体上；最近还报道了交联酶晶体的方法。

固定化酶依不同用途有颗粒、线条、薄膜和酶管等形状，其中颗粒状占绝大多数。食品工业上固定化酶的使用，能将酶和反应物分开，使之产物不含酶，因此不需要加热使酶失活，有助于提高食品的品质，同时也能产生更大的经济效益。

一、酶的固定化方法

酶固定有多种方法，根据固定化酶的应用目的、应用环境不同，可用于固定化制备的物理、化学手段、材料等多种多样。然而，固定化酶的制备和方法选择，需要遵循下面的基本原则。

①必须注意维持酶的催化活性和专一性。酶蛋白的活性中心是酶的催化反应必需的，酶蛋白的空间构象与酶活力密切相关，因此，在酶的固定化过程中应避免酶蛋白的高级结构发生变化，同时要保证酶活性部位不与载体结合。由于蛋白质的高级结构保持稳定是氢键、疏水相互作用和离子键等弱相互作用的结果，因此，固定化时应尽量采取温和的条件，保护好酶蛋白的活性基团。

②固定化的载体必须有一定的机械强度，才能使之在制备过程中不易破坏或受损。而且酶与载体必须牢固的结合，以利于反复使用，同时应尽可能降低生产成本。

③固定化酶应有最小的空间位阻，有利于酶与底物接近，以提高产品质量和增加反应性。

④固定化酶的载体应具有最大的稳定性，在应用过程中，不与任何废物、产物或反应液发生化学反应。

酶的固定化方法有多种，按照结合的方法分为三类：非共价结合法(包括结晶法、分散法、物理吸附法和离子结合法)、化学结合法(交联法和共价结合法)与包埋法(微囊法、网络法)。

1、非共价结结合法

结晶法：是使酶结晶实现固定化的，因此，对于晶体来说，载体就是酶蛋白本身，它提供了非常高的酶浓度。对活力较低的酶来说，这一点更具优越性。这种方法是酶在反复使用时，由于酶耗损而使固定化酶浓度降低。

分散法：是将酶分散或悬浮于水不相溶的有机相中，然后通过离心或过滤的方法将酶固定。这种方法可能引起酶活力降低或影响酶的构象与稳定性。Ottolina 等报道了脂肪酶(LPL)在催化乙酰化反应体系中的作用，酶在水体系中有较高的乙酰化活力，而在甲苯中活力较低，脂肪酶在冻干的过程中失去活力，添加聚乙二醇可显著提高活力。

物理吸附法：是将酶吸附在不溶性载体上的一种固定方法。所用的载体一般是多孔玻璃、活性炭、酸性白土、漂白土、高岭土、氧化铅、硅胶、膨润土、羟基磷灰石、磷酸钙、金属氧化物等无机载体，以及淀粉、白蛋白等天然高分子载体。最近，大孔合成树脂、陶瓷、单宁和疏水基载体(丁基或己基-葡聚糖凝胶)也引起了人们的关注。物理吸附的最大优点是酶活性中心不易被破坏，而且酶的高级结构变化较少，因而酶活损失很小。若能找到适当的载体，这是最理想的方法。但是，酶与载体之间是以弱的相互作用结合，酶易脱落，也易受 pH、浓度和离子强度的影响，使酶从载体上解吸。

离子结合法：是酶通过离子键结合在具有离子交换基的水溶性载体上的固定化方法。常用的阴离子交换剂载体有 DEAE-纤维素，DEAE-葡聚糖凝胶，Amberlite IRA-193、IRA-410、IRA-900；阳离子交换剂载体如 CM-纤维素，Amberlite CG-50、IRC-50、IR-120，Dowex-50 等。离子结合法操作简单、条件温和，酶的高级结构和活性中心不易被破坏，而且酶活回收率较高。但是，酶同载体结合力较弱，容易受离子强度和 pH 的影响。

2、化学结合法

化学结合法是酶通过共价键与载体结合的固定化方法，该法报道较多。一般有两种结合的方式，一是将载体先活化，然后与酶的相关基团发生偶联反应。常选用的载体包括纤维素、葡聚糖、交联葡聚糖、琼脂糖、魔芋葡甘聚糖、胶原、聚丙烯酰胺、尼龙、聚酯、玻璃和陶瓷等。另一种是将载体接上双官能试剂，例如戊二醛、1, 5-二氟-2, 4-二硝基苯，然后将酶偶联上去。可与载体共价结合的酶的官能团有 α -氨基或 ϵ -氨基、 α 、 β 或 γ 位的羧基、巯基、羟基、咪唑基、酚基等。参与共价结合的氨基酸残基不应是酶的活化部位。

共价结合因为比较牢固，即使当底物浓度较高或存在盐等原因时，酶也不易脱落。因此，如何选择性地进行反应是酶固定化的关键。由于反应条件

比较激烈，常会出现酶蛋白高级结构的变化，或破坏部分活性中心，这样酶活回收率较低，一般为 30%左右，甚至底物的专一性也会发生变化。

3、包埋法

包埋法分为网络型和微囊型两种，前者是将酶包埋在高分子凝胶网络中，后者是将酶包埋在高分子的半透膜中。包埋法一般不需要与酶蛋白的氨基酸残基进行结合反应，很少改变酶的高级结构，酶活回收率较高。但是在包埋时发生的化学聚合反应，使酶容易失活。因为只有小分子才能在高分子凝胶网络的微孔中扩散，并且这种扩散阻力会导致固定化酶的动力学行为改变，从而降低酶的活力。因此，包埋法只能适合作用于小分子的底物和小分子产物的酶，对那些作用于大的底物和产物的酶则是不适宜的。

通常采用的载体材料有聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、光敏树脂、淀粉、高纯度魔芋葡甘露聚糖、明胶、胶原、海藻酸和鹿角藻胶等。载体上结合的酶一般为载体质量的 0.1%~10%，酶活力在 0.1~500U/mg。微囊型固定化酶通常是直径为几 μm 到几百 μm 的球状体。颗粒比网络型小得多，有利于底物和产物扩散，但是制备成本较高，反应条件要求也较严格。

二、固定化酶的性质

酶固定化实际上是酶的一种修饰，因此，酶本身的结构必然随着固定化的不同而受到不同程度的影响和变化，同时，酶固定化后，其催化作用由均相转变为异相。再者，酶、底物和载体可能带有电荷，因此产生静电相互作用，上述原因带来的扩散限制效应、空间效应、电荷效应、以及载体性质造成的分配效应等因素都必然会对酶的性质产生影响。

1、固定化后酶活力和稳定性的变化

固定化酶的活力在大多数情况下比天然酶小，其专一性也可能发生变化。例如，胰蛋白酶用羧甲基纤维素载体固定后，对酪蛋白的活力降低 30%。这主要是由于在固定化过程中酶的空间构象发生变化或因空间位阻及扩散阻力，直接影响到活性中心和底物的定位。酶在包埋后，使大分子底物不能透过膜与底物接触。然而也有极少数情况，酶与载体交联后提高了酶的稳定性而使酶活力提高。

大多数情况下酶固定化后其稳定性都有不同程度增加，这是十分有利的。Merlose 曾对 50 种固定化酶的稳定性进行了研究，发现其中有 30 种酶固定化后稳定性提高，只有 8 种酶的稳定性降低。固定化酶的稳定性提高主要表现在耐热性增加，以及对有机试剂和酶抑制剂耐受性的提高。酶固定化后也可能使最适反应 pH 的范围改变，这是由于酶在固定化时与载体多点连接，从而

防止了酶蛋白分子的伸展，而且减少了与其他分子反应的基团。此外，酶固定化后其活力可缓慢释放，因此使酶的稳定性比天然状态高。

2、固定化酶最适条件的变化

酶固定化后由于热稳定性提高，因而最适反应温度发生变化，一般比固定以前提高。但也有少数报道例外。

酶的催化能力对环境pH非常敏感。固定化酶对底物作用的最适pH变化可达1~2个pH单位，而且酶活力-pH曲线也会发生一定的偏移，一般二者的曲线关系已再不是钟形曲线。这主要是微环境表面电荷带来的影响所致。通常，带负电荷的载体，其最适pH较游离酶偏高。这是由于载体的聚阴离子效应，使固定化酶扩散层的H⁺浓度比周围外部溶液高，这样外部溶液的pH只有向碱性偏移，才能抵消微环境作用。反之，使用带正电荷的载体其最适pH向酸性偏移。

3、固定化酶对米氏常数的影响

固定化酶的表现米氏常数 K_m' 随载体的带电性能而变化。当酶结合于电中性载体时，由于扩散限制造成 K_m' 上升。然而对带电载体，由于载体和底物之间的静电相互作用，将引起底物分子在扩散层和整个溶液之间的不均匀分布，产生电荷梯度效应，结果造成与载体电荷相反的底物，在固定化酶微环境中的浓度高于整体溶液。因此，固定化酶即使在溶液的底物浓度较低时，也可达到最大反应速率，即固定化酶的表现米氏常数 K_m' 低于溶液的 K_m 值。然而，当载体与底物电荷相同时，就会造成固定化酶的表现米氏常数 K_m' 值显著增加，这是根据 Hornby 等提出的固定化酶催化反应扩散动力学方程得到的。采用流动柱状反应器时固定化酶的反应速率和表现米氏常数分别为

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m' + [S]}$$
$$K_m' = [K_m + \frac{xV_{\max}}{D}] \frac{RT}{RT - xzFV}$$

式中 x ，Nernst 扩散层厚度； D ，底物扩散系数； z ，底物的价数； F ，Faraday 常数； V ，载体附近的电位梯度。

$[K_m + \frac{xV_{\max}}{D}]$ 项称为扩散项。严格地说，项中 K_m 和 V_{\max} 不是扩散系数，而

只有 x 和 D 才是与扩散有关的参数。由扩散项可知， K_m' 随 x/D 减小而降低，当 x/D 的极限值趋于零时， K_m' 接近 K_m ，通常采用小的载体和提高流动速度（或搅拌速度）可使扩散层厚度 x 减小。其中 D 与反应体系组成有关。

$\frac{RT}{RT - xzFV}$ 为静电项。如果 z 与 V 具有相同符号，即底物和载体带有相同电荷，

则静电项大于 1, K_m' 增大; 如果 z 与 V 符号相反, 那么静电项小于 1, 相应 K_m' 减小; 如果 z 与 $V=0$ 。那么静电项等于 1, 此时 K_m' 仅是扩散因素的函数。

这里必须指出, 在上述固定反应器中, 酶的催化反应速率 v 不再是 v_0

, 然而实际工作中总是期望底物尽可能多地转变成产物。酶在反应器中所遵从的反应速率动力学, 取决于反应时间。可用下式表示

$$k_2[E]_0 t = K_m \ln([S]_0/[S]) + ([S]_0 - [S])$$

式中 k_2 , 速率常数; $[E]_0$, 酶的总浓度; t , 底物在反应器中停留的时间。

载体引起的电荷效应使 K_m' 发生变化, 实际上, 这是由于酶蛋白分子的高级结构发生变化和载体的静电相互作用影响了酶与底物的亲和力, 从而使 K_m' 发生变化。 K_m' 的变化程度与溶液中的离子强度有关。一般在高离子强度时, K_m' 接近原酶的 K_m 值。

三、固定化酶在食品中的应用

固定化酶尽管有许多优点, 但是真正用于食品加工中的却很少, 然而在食品分析中应用较多。淀粉转化为果糖是最有意义的体系。在淀粉转化的过程中需要将淀粉颗粒加热到 105℃ 使之被破坏, 但是由于淀粉溶胀, 溶液的粘度太高, 不利于酶的催化反应进行, 如果此时使用热稳定性相对较高的地衣形芽孢杆菌 (*Bacillus lichenformis*) 产生的 α -淀粉酶, 将淀粉水解到 DP=10, 但是, 在如此高的温度下, 淀粉和溶剂中的任何微生物都会遭到破坏, 因此, 上述途径毫无实际意义。如果将葡糖淀粉酶和葡萄糖异构酶固定在柱状反应器上, 对淀粉进行水解和异构化催化反应, 则是十分有利的, 而且相对较稳定, 至于柱子的污染和再生也不存在问题。此外, 在食品加工中应用的还有氨酰基转移酶 (aminoacylase)、天冬氨酸酶 (aspartase)、富马酸酶 (fumarase) 和 α -半乳糖苷酶 (α -galactosidase) 等固定化酶。一些国家将乳糖酶固定在载体柱上, 用以水解牛奶中的乳糖为半乳糖和葡萄糖, 生产不含乳糖的牛奶以满足乳糖酶缺乏的人群的需要。

第五节 食品加工中的酶制剂

自然界有许许多多的生物物质, 例如淀粉、纤维素、木质素、脂类、核酸和蛋白质需要转化, 那么首先需要的是淀粉酶、纤维素酶、木质素过氧化物酶、脂肪酶、核酸酶和蛋白酶, 其需要量是如此之大。然而存在的主要问题

是以上例举的潜在底物的不溶性或溶解性差，使酶不能有效催化。虽然有些方法可以增加溶解度和水解速率，但是需要消耗价值昂贵的能量，使之在目前不经济。在生物质的转化过程中必须是环境上可接受的，而且产品是无害的。

在食品加工中所用的酶制剂，目前已有几十种。例如葡萄糖、饴糖、果葡糖浆等甜味剂与啤酒、酱油等的生产，蛋白质制品和果蔬的加工，乳制品和焙烤食品中的应用，食品保鲜以及食品品质和风味的改善等。应用的酶制剂主要有 α -淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、葡萄糖异构酶、果胶酶、脂肪酶、纤维素酶和葡萄糖氧化酶等，这些酶主要来自可食的或无毒的植物、动物，以及非致病、非产毒的微生物。世界食品用酶有50%以上是由Novo Nordisk公司提供的，其中有60%的酶是由基因改组的微生物生产的，但必须指出，对于基因重组的酶在食品工业中应用要进行严格的安全评价，目前食品工业中主要应用的酶制剂见表6-8。

表6-8 食品工业中应用的酶制剂

酶	来源	主要用途
α -淀粉酶	枯草杆菌、米曲霉、黑曲霉	淀粉液化、生产葡萄糖、醇等
β -淀粉酶	麦芽、巨大芽孢杆菌、多黏芽孢杆菌	麦芽糖生产、啤酒生产、焙烤食品
糖化酶	根霉、黑曲霉、红曲霉、内孢酶	糊精降解为葡萄糖
蛋白酶	胰脏、木瓜、菠萝、无花果、枯草杆菌、霉菌	肉软化、奶酪生产、啤酒去浊、香肠和蛋白胨及鱼脞加工
纤维素酶	木霉、青霉	食品加工、发酵
果胶酶	霉菌	果汁、果酒的澄清
葡萄糖异构酶	放线菌、细菌	高果糖浆生产
葡萄糖氧化酶	黑曲霉、青霉	保持食品的风味和颜色
橘苷酶	黑曲霉	水果加工、去除橘汁苦味
脂肪氧化酶	大豆	焙烤中的漂白剂
橙皮苷酶	黑曲霉	防止柑橘罐头和橘汁浑浊
氨基酰化酶	霉菌、细菌	DL-氨基酸生产 L-氨基酸
乳糖酶	真菌、酵母	水解乳清中的乳糖
脂肪酶	真菌、细菌、动物	乳酪的后熟、改良牛奶风味、香肠熟化
溶菌酶		食品中的抗菌物质

一、甜味剂生产使用的酶制剂

玉米淀粉的转化已经有许多成功的产品，例如采用 α -淀粉酶、糖化酶和葡萄糖异构酶催化玉米淀粉生产不同聚合度的糖浆、葡萄糖和果糖以及饴糖、麦芽糖等。在这些甜味剂的生物催化加工中，酶起着极为关键的作用，因此，必须保证酶的高度专一性，同时除去影响酶作用的有毒成分，使之得到理想的食品配料和满足食品加工所需的功能特性。例如淀粉在糖化过程中所采用的 α -淀粉酶和糖化酶要求达到一定的纯度，应不含或尽量少含葡萄糖苷转移酶，因为葡萄糖苷转移酶会生成不需要的异麦芽糖。

在甜味剂的生物技术生产中，高果糖玉米糖浆的生产就是一个成功的实例。生产过程使用的酶都是固定化的，因为 α -淀粉酶固定化后，不存在外部扩散限制，可以多次连续反应，因此只有通过酶的固定化才能提高酶的耐热性。表 6-9 列出了生物催化生产的某些甜味剂。

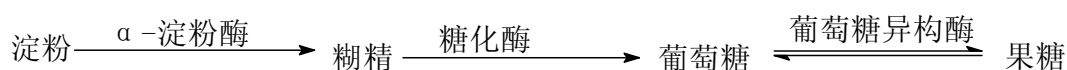


表 6-9 生物催化生产的某些甜味剂

原料	产品	酶
淀粉	玉米糖浆	α -淀粉酶、支链淀粉酶
	葡萄糖	α -淀粉酶、糖化酶
	果糖	α -淀粉酶、糖化酶，葡萄糖异构酶
淀粉+蔗糖	蔗糖衍生物	环状糊精葡萄糖基转移酶和支链淀粉酶(或异构酶)
蔗糖	葡萄糖+果糖	转化酶
蔗糖	异麦芽寡糖	β -葡萄糖基转移和异麦芽寡糖合成酶
蔗糖+果糖	明串珠菌二糖	α -1,6-糖基转移酶
乳糖	葡萄糖+半乳糖	β -半乳糖苷酶
半乳糖	半乳糖醛酸	半乳糖氧化酶
	葡萄糖	半乳糖表异构酶
几种化合物 斯切维昔	L-天冬氨酰-L-苯丙氨酸甲酯	嗜热菌蛋白酶、青霉素酰基转移酶
	α -糖基化斯切维昔	α -葡萄糖苷酶
	Ribandioside-A	β -糖基转移酶

此外，在焙烤食品的生产中，为了保证面团的质量，通常添加 α -淀粉酶，以调节麦芽糖的生成量，使产生的二氧化碳和面团气体的保持力相平衡。制造糕点中加入转化酶，使蔗糖水解为转化糖，防止糖浆中的蔗糖结晶析出。

二、纤维素酶和果胶酶在食品加工中的应用

纤维素酶的作用是水解纤维素，增加其溶解度和改善风味，例如在焙烤食品、水果和蔬菜泥生产、茶叶加工和土豆泥的生产中经常使用。目前的纤维素酶主要是由微生物生产的，而且非常有效，它的结构和功能可以通过基因或克隆确定。纤维素酶根据它作用于纤维素和降解的中间产物可以分为四类。

1、内切纤维素酶(endoglucanases) (1,4(1,3;1,4)- β -D-葡聚糖 4-葡聚糖水解酶, EC 3.2.1.4) 作用于棉花和微晶粉末纤维素的结晶区是没有活性的, 但是它们能水解底物(包括滤纸、可溶性底物, 例如羧甲基纤维素和羟甲基纤维素)的无定形区。它的催化特点是无规水解 β -葡萄糖苷键, 使体系的粘度迅速降低, 同时也有相对较少的还原基团生成。反应后期的产物是葡萄糖、纤维二糖和不同大小的纤维糊精。

2、纤维二糖水解酶(cellobiohydrolases) (1,4- β -D-葡聚糖纤维二糖水解酶, EC 3.2.1.91) 是外切酶, 作用于无定形纤维素的非还原末端, 依次切下纤维二糖。纯化的纤维二糖水解酶对棉花几乎没有活性, 但是能水解大约 40% 微晶粉末纤维素中可水解的键。相对于还原基团的增加, 粘度降低较慢。内切纤维酶和纤维二糖水解酶催化水解纤维素的结晶区, 具有协同作用。有关机制尚不清楚。

3、外切葡萄糖水解酶(exoglucosylhydrolases) (1,4- β -D-葡聚糖葡萄糖水解酶, EC 3.2.1.74) 从纤维素糊精的非还原末端水解葡萄糖残基, 水解速率随底物链长的减小而降低。

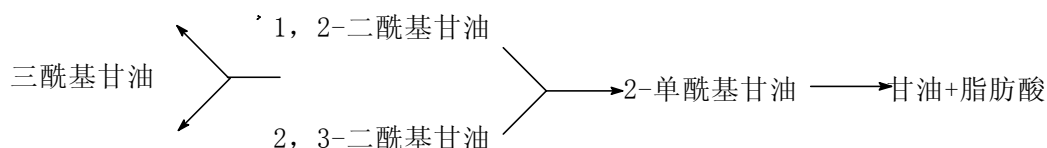
4、 β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidases) (β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶, EC 3.2.1.21) 裂解纤维二糖和从小的纤维素糊精的非还原末端水解葡萄糖残基。它不同于外切葡萄糖的水解酶, 其水解速率随底物大小的降低而增加, 以纤维二糖为底物时水解最快。

果胶酶在水果加工中是最重要的酶, 广泛存在于各类微生物中, 可以通过固体培养或液体深层培养法生产。主要用于澄清果汁和提高产率。通过降低黏度, 使悬浊物质失去保护胶体而沉降。脱果胶的果汁即使在酸糖共存的情况与也不致形成果冻, 因此可用来生产高浓缩果汁和固体饮料。例如苹果、无花果、葡萄汁的生产, 在果肉破坏后有较高的粘稠度, 很难过滤和提高果汁的产率。一旦加入果胶酶后即可使黏度降低, 有利于汁、渣分离。此外, 在橘子罐头加工中, 常使用果胶酶和纤维素酶脱囊衣, 以代替碱处理。在面包制造过程中, 添加适量的 α -淀粉酶和蛋白酶, 以缩短面团的发酵时间和改善面包质量及防止老化。

三、脂肪酶在食品加工中的作用

脂肪酶水解三酰甘油为相应的脂肪酸、甘油单酯、甘油双酯和甘油。根据立体专一性将脂肪酶分为 1, 3-型专一性、2-型专一性或非专一性脂肪酶。脂肪酶广泛分布在植物、动物和微生物中，一般是以液体形式存在，固体脂肪酶催化水解较慢、脂肪酶主要用于食品的特殊风味形成，例如奶酪、面包以及焙烤食品的保鲜。在巧克力奶的制作中，利用脂肪酶对牛奶中的脂肪进行限制性水解，可以增强产品的“牛奶风味”。特别是在定向酯交换和三酰甘油位置分析中脂肪酶具有重要的意义，但在酯合成的实际应用中还有相当大的距离。

脂肪酶一般按下列方式水解三酰基甘油



然而，也存在一些例外，这取决于酶的位置专一性和脂肪酸专一性。

四、蛋白质食品加工中使用的酶制剂

蛋白质是食品中的主要营养成分之一，所有的生物质中都含有蛋白质，在肉、豆类、坚果、谷物中大约含 2%~35%的蛋白质。通常蛋白质在水中溶解度较小，可以被来自植物和微生物中的蛋白酶迅速水解。几乎在所有的生物材料中都含有内切和外切蛋白酶。在啤酒、奶酪、酱油和肉制品生产中蛋白酶的应用较为普遍。蛋白质和肽序列分析中蛋白酶的应用也十分广泛。

蛋白酶一般来源于动物、植物和微生物，不同来源的蛋白酶在反应条件和底物专一性上有很大差别。在食品加工中应用的蛋白酶主要有中性和酸性蛋白酶。这些蛋白酶包括木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、凝乳酶、枯草杆菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶等。

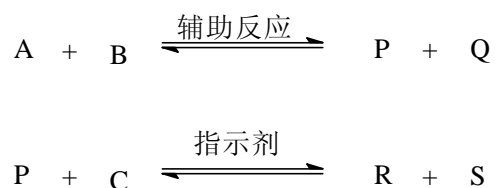
蛋白酶催化蛋白质反应后生成小肽和氨基酸，有利于人体消化和吸收。蛋白质水解后溶解度增加，其他功能特性例如乳化能力和起泡性也随之改变。如果蛋白质的平均疏水性较高，则水解可能产生苦味物质。因此，加工过程中必须控制酶对蛋白质的水解程度。或者几种蛋白酶共同作用，使苦味肽进一步分解，以除去苦味。通常利用木瓜蛋白酶或菠萝蛋白酶配制肉类嫩化剂，

分解肌肉结缔组织的胶原蛋白。凝乳酶水解牛奶中的 κ -酪蛋白生产干酪。在啤酒发酵完后，添加木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶或霉菌酸性蛋白酶降解蛋白质，以防止啤酒浑浊，延长啤酒的货架期。酱油和豆浆生产中，利用蛋白酶催化大豆水解，不仅使生产周期大大缩短，而且还可提高蛋白质的利用率和改善产品风味。此外，在牛肉汁和鸡汁的生产中常用蛋白酶提高产品收率，如果将酸性蛋白酶在中性 pH 条件下处理冻鱼类，可以脱除腥味。

第六节 酶在食品分析中的应用

酶法分析是一种经常采用的方法，相对化学分析具有快速、专一、高灵敏度和高精度等优点。通常的食品分析需要对样品进行分离、纯化，特别是对含量很低的化合物，往往会带来较大误差。然而采用酶法分析却无需将待测物和其他组分分离，例如测定血液、尿和植物中的葡萄糖含量，不需要任何分离步骤，只要除去干扰吸光度的不溶物，即可以直接采用葡萄糖氧化酶比色。酶的催化反应的条件一般较温和，大多数在接近室温和中性 pH 条件下进行，仅需要在几分钟内即可完成。因此，可以避免或限制非酶引起的化合物变化。对于非需宜的酶促反应可以通过污染或失活的方法除去。固定化酶由于能重复使用，在食品分析中应用较广，目前使用的有固定化酶柱，酶电极，含酶的薄片和酶联免疫分析(ELISA)。

酶法分析中最好选择分光光度法和电化学方法测定反应物和底物。当这两种方法不适用时，可以采用复合酶分析。复合反应中包括一个辅助反应和一个指示剂反应，前者是将食品成分中的反应物转变为产物，后者涉及到一个指示酶或它的反应物或产物，在整个反应中是形成还是分解是很容易分析的。在大多数情况下，指示剂的反应是在辅助反应之后发生。



上式中 A 是被分析的食品成分，C 或 R 或 S 是被测定物。复合反应的平衡状态与浓度有关，但反应必须通过某些方法进行调整。也可以通过几个依次发生的辅助反应和一个指示反应，同时测定食品成分中的几个组分。例如测定食品中的葡萄糖、乳糖和蔗糖含量。其辅助反应是葡萄糖用 ATP 磷酸化，以及乳糖和蔗糖分别在 β -半乳糖苷酶和 β -果糖苷酶的作用下裂解为葡萄糖和半乳糖及葡萄糖和果糖，然后再将葡萄糖磷酸化。最后根据葡萄糖-6-磷酸

是 NADP 依赖的指示剂反应的底物进行反应，从而测定食品中葡萄糖、乳糖和蔗糖的含量。

食品酶学分析包括测定食品成分和食品中的酶活，所测定的食品成分可以作为酶的底物，也可以作为酶的抑制剂。同时必须了解影响酶活力的所有因素。

一、被测化合物是酶的底物

当被测化合物是酶的底物时，根据底物消耗的情况，可以分别采用终点测定法和动力学的方法。

1、终点测定法

终点测定法又称为总的变化方法(图 6-19)，只有当反应进行比较完全时该方法才是一种可靠的分析方法。根据反应前后酶反应体系的吸光度或荧光强度的总变化，测定产物(或底物)的量。与动力学方法比较，食品中待分析的底物浓度绝对不能低于酶催化辅助反应的米氏常数 K_m 。当酶反应遵循一级反应动力学时，反应速率是很容易计算的。

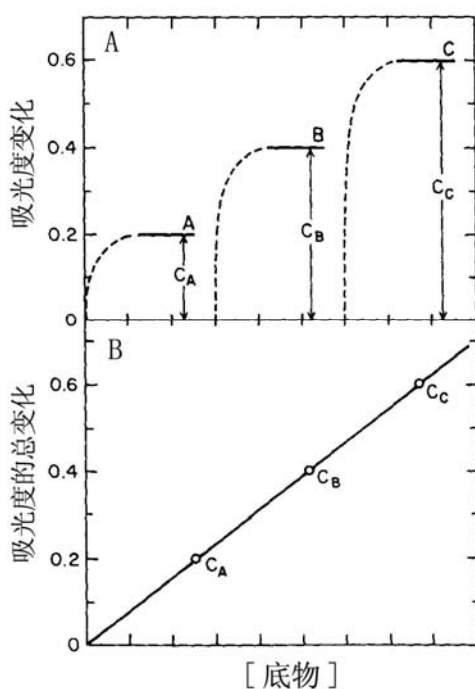


图 6-19 底物浓度对吸光度的影响

- (1) C_A 、 C_B 和 C_C 3 个底物浓度对吸光度变化的影响，吸光度最初变化快，以至反应在几分钟内即可完成。在此方法中仅需要知道最初和最终吸光度。
- (2) 根据 (1) 中的数据，得到底物浓度和吸光度总变化的相关图。

终点法的优点是不需要精确地控制酶反应的pH和温度，然而需要较多的酶使反应在2~10min内完成，表6-10列出了在终点法中所用的酶浓度。在某些情况下，酶催化反应不能进行完全就已达到平衡，此时可以通过提高反应物浓度或去除反应的某一产物，从而打破平衡，使其向有利于产物的方向进行。例如，在乳酸脱氢酶催化反应中，乳酸和NAD⁺是底物，反应生成丙酮酸，可以加入草氨酸除去。使反应向产物方向进行。另外，可以在完全相同的反应条件下，制作标准曲线，然后通过标准曲线得到待测化合物的浓度。

表6-10 食品酶学分析中，采用终点法所需要的某些酶的浓度

底物	酶	K_m	酶浓度(μ cat/L)
葡萄糖	己糖激酶	1.0×10^{-4} (30°C)	1.67
甘油	甘油激酶	5.0×10^{-5} (25°C)	0.83
尿酸	尿酸氧化酶	1.7×10^{-5} (20°C)	0.28
富马酸	富马酸酶	1.7×10^{-6} (21°C)	0.03

2、动力学方法

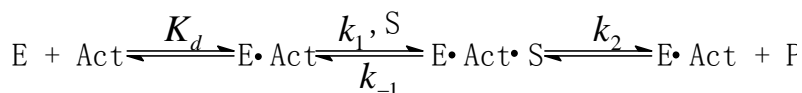
动力学方法是根据测量反应速率，以得到底物浓度。尽管 v_0 和 $[S]_0$ 不是线性的，但是一条相对正常的双曲线。当 $[S]_0 > 100 K_m$ ，酶催化反应的速率与底物无关，显然不能从测定酶催化反应的速率，计算作为酶底物的待测物浓度。因此，被测定化合物的浓度必须小于 $100 K_m$ （一般在 $0.1 \sim 10 K_m$ 之间，最好小于 $5 K_m$ ），这样即可根据方程

$$v_0 = \frac{V_{\max} [I]_0}{K_m + [S]_0}$$

求出 $[S]_0$ 。根据Lineweaver-Burk方程，以 $1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 作图制作标准曲线，然后从标准曲线测定待测物浓度。该方法不易受干扰，可以进行自动分析，但是对反应条件(例如酶浓度、pH和温度)要求严格控制，待测物的测定和标准曲线制作的条件应完全相同。另外，要求分析使用的酶具有高的 K_m ，以便测定较高的底物浓度。动力学方法对裂解酶和异构酶特别适宜，当水含量保持不变时，水解酶催化的水解反应也可以认为是单底物反应。

二、被测定的化合物是酶的激活剂或抑制剂

某些酶，但不是所有的酶，必须要有辅助因子存在才显示活性。辅助因子可以是有机化合物，例如磷酸吡哆醛或NAD⁺，也可以是金属离子例如Zn²⁺或Mg²⁺。因此，当一个酶催化反应加入激活剂后，则 v_0 以可重现的方式增加，食品分析即是建立在此理论基础之上的。



式中Act为激活剂。从上式可以看出激活剂浓度与 v_0 之间的关系，如果激活剂牢固地与酶结合(辅基，例如 $K_d < 10^{-9} \text{mol/L}$ ，那么 v_0 与 $[Act]$ 呈线性关系；如果激活剂与酶是松散地结合 $K_d > 10^{-9} \text{mol/L}$ ，则 v_0 与 $[Act]$ 的关系是曲线。待测化合物是松散结合的激活剂，那么就十分类似于测定底物浓度。

当食品中的待测化合物是酶法分析中使用的酶的抑制剂时，则降低反应速率 v_0 。这些化合物与酶能可逆与不可逆地结合，因而要设计一个实验解释反应的结果，这与测定酶、底物或活化剂的浓度相比，则是相当复杂的。

三、食品热烫和灭菌效果的酶指示剂

前面已经强调，酶是鉴定食品热处理的理想指示剂。当然，这并不完全是测定酶活的真正意义，实际上在对未加工食品的品质评价、优化特定食品中的加工参数、以及酶制剂使用之前的分析，酶活的测定都是十分重要的。

蔬菜和水果热烫是一种温和的热处理，主要是为了防止酶引起的食品变质和贮藏过程中微生物生长。因此食品的有限加工是为了使食品在1~2周内冷冻保藏，或干制品贮存1~2年能保证安全和质量。蔬菜中的微生物在低温下比大多数酶更易破坏。因此，食品在冷冻和解冻过程中，酶会因为细胞的完整性被破坏而释放出来。这样，就可以根据测定释放出的酶的酶活力，检测食品原料在冷冻和解冻时的质量变化。

同样也可以根据温和热处理和灭菌前后酶活力的变化，指示品质的变化和热处理是否充分。例如水果和蔬菜中的过氧化物酶，牛奶制品和火腿中的碱性磷酸酶，蛋品中的 β -乙酰氨基葡萄糖苷酶，尽管它们对食品质量不会带来影响，然而由于这些酶相对其他酶具有更高的热稳定性，而且又容易正确测定它们的酶活力，因而它们是很重要的指示剂。

表 6-11 评价食品质量的酶指示剂

目的	酶	食品原料
适度热处理	过氧化物酶	水果和蔬菜
	碱性磷酸酶	乳、乳制品、火腿
	β -乙酰氨基葡萄糖苷酶	蛋
冷冻和解冻	苹果酸酶	牡蛎
	谷氨酸草酰乙酸转氨酶	肉
细菌污染	酸性磷酸酶	肉、蛋

	过氧化氢酶	乳
	谷氨酸脱羧酶	乳
	过氧化氢酶	青刀豆
	还原酶	乳
昆虫污染	尿酸酶	保藏谷物
	尿酸酶	水果产品
新鲜程度	溶血卵磷脂酶	鱼
	黄嘌呤氧化酶	鱼中次黄嘌呤
成熟度	蔗糖合成酶	马铃薯
	果胶酶	梨
发芽	淀粉酶	面粉
	过氧化物酶	小麦
色泽	多酚氧化酶	咖啡、小麦
	多酚氧化酶	桃、鳄梨
	琥珀酸脱氢酶	肉
风味	蒜氨酸酶	洋葱、大蒜
	谷氨酰胺酰基转肽酶	洋葱
营养价值	蛋白酶	消化能力
	蛋白酶	蛋白质抑制剂
	L-氨基酸脱羧酶	必需氨基酸
	赖氨酸脱羧酶	赖氨酸

水果的成熟度与许多酶的活力变化相关,可以果胶酶作为判断梨成熟度的指示剂。颜色和风味是评价食品质量,乃至新鲜程度的重要指标,多酚氧化酶的活力反映了富含多酚类的水果、蔬菜褐变的程度,例如桃、鳄梨、莲藕和苹果等,可以用多酚氧化酶指示它们在加工和贮藏过程的褐变度。同样,一些特殊风味酶可以作为某些蔬菜、水果特征风味强弱的指示剂,当洋葱和大蒜的细胞受损后,由于蒜氨酸酶的作用,使风味增强。以上说明,各类食品原料都可以选用特征的酶作为它们加工、贮藏过程中品质变化的指标。

酶活力的测定,实际上是测定酶催化反应的速率,因此应该在酶的最适反应条件下测定其活力,包括缓冲液的类型、离子强度、pH、温度和底物浓度等,其中温度是一个尤为重要的参数,对测定结果影响很大。温度的变化对反应速率影响非常显著,例如,温度上升 1℃会导致反应活性增加 10%,因此,在可能的情况下尽量将温度恒定在 25℃。此外,在酶活力分析中也要注意底物浓度的调整,使之满足酶催化反应方程。