

生物工程知识小丛书

充满希望的酶工程

Q55
Z2M1

天津科学技术出版社

105253

105250

生物工程知识小丛书

充满希望的酶工程

朱祚铭 高才昌 编

天津科学技术出版社

责任编辑：周喜民
罗愉先

生物工程知识小丛书

充满希望的酶工程

朱祚铭 高才昌 编

*

天津科学技术出版社出版

天津市赤峰道130号

天津市蓟县印刷厂印刷

新华书店天津发行所发行

*

开本 787 × 1092毫米 1/32 印张 4.375 字数 90,000

一九八六年十月第一版

一九八六年十月第一次印刷

印数：1-3,000

书号：14212·181 定价：0.68元

出版说明

生物工程是近年发展起来的一门新兴学科。它是借助生物体及其机能，以先进的科学和工程技术人工进行生物转化，从而运用于物质生产的技术体系。生物工程将是二十一世纪最有发展前途的学科。它将对工、农业生产、医药乃至人类社会的文明、进步起着不可估量的作用。因此它引起了国内外学术界的极大关注，成为世界经济、科技发展的追求目标。

生物工程的研究与开发工作，已由医药卫生、食品、饲料扩展到化工、纤维、替代能源及农业等各个领域，我国在这方面的研究工作已取得不少进展。为使广大群众对这方面的知识有所了解，我们出版了这套生物工程知识小丛书。

这套小丛书包括《潜力巨大的基因工程》、《前途广阔的细胞工程》、《充满希望的酶工程》、《生机勃勃的发酵工程》。本丛书力图以通俗易懂的语言，形象恰当的比喻，深入浅出地把生物工程的基本知识介绍给读者。

目 录

第一章 酶工程的起源和发展	(1)
第一节 什么是酶工程	(1)
第二节 酶工程发展的历史	(2)
第三节 我国酶工程的概况	(7)
第二章 酶的概述	(10)
第一节 酶的本质	(11)
第二节 酶的催化特性	(12)
第三节 酶的结构和作用原理	(14)
第四节 影响酶作用的因素	(16)
第五节 酶的分类	(19)
第三章 酶的分离提纯	(22)
第一节 酶的分离提纯	(22)
第二节 酶活力的测定	(34)
第三节 酶制剂	(36)
第四章 固定化酶	(38)
第一节 固定化酶的主要制备方法	(39)
第二节 固定化酶的性质	(50)
第三节 固定化酶的应用	(61)
第四节 辅酶的固定化	(88)
第五章 固定化细胞	(91)
第一节 固定化细胞的种类	(91)

第二节	固定化细胞的制备方法	(94)
第三节	固定化细胞的特性	(103)
第四节	固定化细胞的应用	(107)
第六章	酶工程的展望	(127)
第一节	扩大工程酶的种类和酶的来源	(127)
第二节	扩大酶工程的应用范围	(129)
第三节	改进固定化技术和反应器	(130)
第四节	结束语	(131)

第一章 酶工程的起源和发展

第一节 什么是酶工程

随着酶学研究的迅速发展，特别是酶的应用的推广，使酶学和工程学相互渗透和结合，发展成一门新的技术科学——酶工程。酶工程是工业上有目的地设计一定的反应器和反应条件，利用酶的催化功能，在常温常压下催化化学反应，生产人类需要的产品或服务于其它目的的一门应用技术，也就是把酶或细胞直接应用于化学工业的技术系统。从目前看，主要包括酶和细胞的固定化技术，反应器，反应的检测和控制等，广义一些讲，还应包括酶的生产、分离和纯化。

众所周知，酶的特点之一是催化效率高，比一般的化学催化剂的效率要高千万倍甚至千亿倍以上。固定化酶除仍具有酶的这一催化特点外，使酶的稳定性明显提高，还具有使反应过程管道化、自动化，产物易从反应液中回收等优点。这就使酶作为工业催化剂的价值大为提高。

酶工程是生物工程的重要组成部分。生物工程学（Biotechnology），原名生物工艺学，早期主要是指微生物发酵，近十多年来，由于基因工程的兴起，酶工程的发展，为经典的生物工艺提供了新的理论和技术手段，使生物工程学进入了分子水平。生物工程是一门新兴的综合性科学技术，是当代新技术革命的重要领域之一，它融合多门学科为一

体，涉及生物化学、微生物学、遗传学、物理学、化学、工程技术、社会学等内容。因此我国学者普遍认为生物工程学一词比生物工艺学更为确切。1983年5月在英国伦敦召开的首次世界生物工程学会议上，对生物工程学给了一个简明的定义——达到特殊目的的生物过程的控制性工程。即是将生物体内所进行的精巧的生物化学反应工业化，在人类的控制下制造出有用产品的技术体系。生物工程主要包括四大技术体系：基因工程，细胞工程，酶工程和微生物工程。其核心是基因工程和酶工程。基因工程本身并不是一种独立的生产技术，通过基因工程可以改变生物的产酶量和酶系，真正发挥工业效益还是要靠发酵工程和酶工程来实现，尤其酶工程更为有效。因此从某种意义上讲，酶工程在工业生产上的作用更直接一些，容易见到近期的效益。所以我们要重视酶工程的研究和开发，这是符合生物工程发展不平衡的实际情况的。

第二节 酶工程发展的历史

化学工业生产大量的化工产品，大大地丰富了人们的生活，为人类社会的发展作出了重要贡献。但是随着化学工业的发展，也越来越暴露出它的弊端。在生产人类有用产品的同时，产生了大量有害的物质，污染了环境，破坏了自然界的生态平衡，甚至危及人类的健康和生命安全。同时，化学工业在生产中常常需要高温高压，这必然要耗费大量的能源及大量的设备投资。由于石油、煤碳等能源储量都是有限的，为了改变未来的资源和能源结构，除了积极开发新的能源外，必须采用节能而且效率高的生产技术。由于人们对酶

的研究和认识的发展，预示了酶的应用可能为改造和发展现有化学工业开辟一条有效的途径。因为工业上的大多数化学反应能用化学催化剂催化，同时亦几乎都可以用一种或多种酶催化，显而易见，工业上许多化学催化的反应可用酶催化来代替。酶，作为生物催化剂，具有大多数化学催化剂所不具备的优点：酶的催化活性极高，远远超过一般化学催化剂；酶的催化作用具有专一性，反应的副产物少；酶能在温和的条件下如常温常压和水溶液中起催化反应，耗能少。因此，酶的应用正好能够克服化学工业出现的弊端。如果酶能在工业上广泛应用，充分发挥它的高效、专一、节能的特点，就可达到简化工艺、降低能源消耗、节省设备投资和减少环境污染的目的，使工业面貌发生明显改观。因此积极探索和研究酶的应用技术受到世界各国尤其是发达国家的重视，推动了酶工程的迅速发展。

酶工程是在人类原始的应用酶的催化作用的基础上逐渐发展起来的。二十世纪以来，特别是二十世纪五十年代以来，酶的应用技术有了很大的进步。五十年代酶制剂的生产有了迅速发展，这一时期主要是溶液酶的应用；六十年代出现了固定化酶技术，六十年代末已应用于工业生产；七十年代出现了固定化细胞的技术；至目前又发展了固定化增殖细胞的研究，亦发展了包括辅助因子再生的固定化多酶反应体系的研究。

人类原始应用酶的催化作用可谓源远流长。我国劳动人民在四千年前已掌握了酿酒技术，商朝的酿酒业已相当发达，秦汉前已将麦芽用于制造饴糖等等。但是直到十九世纪人们才逐渐建立起“酶”的概念。1908年罗门等利用胰酶鞣

制皮革，1917年法国人博伊丁和埃芬特用枯草杆菌产生的淀粉酶用作纺织工业上的退浆剂。此后酶在工业上应用的研究逐渐深入到很多工业部门。到了1949年，由于日本采用深层培养法生产细菌 α -淀粉酶获得成功，才使酶制剂的生产和应用进入工业化的阶段。从此，蛋白酶、果胶酶、转化酶等相继投入市场。1959年由于采用葡萄糖淀粉酶催化淀粉生产葡萄糖的新工艺研究成功，彻底革除了原来葡萄糖生产中需要高温高压的酸水解工艺，使淀粉得糖率由80%提高到100%，致使日本1960年的精制葡萄糖产量猛增10倍。由于这项改革的成功，大大促进了酶在工业上应用的发展，先后出现了不少成功的应用实例。如5'-磷酸二酯酶用于5'-核苷酸的生产，用青霉素酰胺酶制备6-氨基青霉烷酸（6-APA），氨基酰化酶拆分DL-氨基酸， β -酪氨酸酶催化生产L-多巴等等。五十年代，尽管酶的应用有很大发展，但与酶学研究的进展相比，其发展还是缓慢的，主要原因是酶的生产应用技术落后。由于酶的分离纯化比较复杂，分离的酶稳定性显著下降，并且采用在水溶液中分批反应，反应后的酶很难回收，致使成本很高，阻碍了酶应用的进一步发展。

六十年代固定化酶技术的工业应用是酶工程发展的重要转折。固定化就是采用化学或物理的方法将酶束缚在载体上，限制酶分子在一定区间内进行催化作用。固定化酶就是酶与高分子材料等载体结合，使酶性能稳定，是一种使用方便的酶制品。酶经过固定化后具有许多优点。很多酶经过适当方法固定化后，提高了稳定性，在反应后容易将酶和底物、产物分开，不仅使酶可以在较长时间内反复使用，而且还可以采用装柱等连续反应的方法应用于生产，反应终点亦

容易控制。这便可使生产工艺实现自动化和连续化，大大提高了酶使用的效率。早在1916年纳尔逊和格里芬发现了蔗糖酶结合于骨炭末上仍具有蔗糖酶的活力，但未引起人们的注意。1953年格拉布霍夫和施雷思将一些酶如羧基肽酶、淀粉糖化酶、胃蛋白酶和核糖核酸酶用重氮化聚氨基聚苯乙烯树脂进行固定化。但六十年代以前，固定化酶的研究报告没有超过十篇。由于卡切尔斯基的努力，才将固定化酶的研究推上迅速发展的阶段。1969年千畑一郎首先在工业上应用固定化氨基酰化酶拆分DL-氨基酸制造L-氨基酸。进入七十年代，各国科学家对固定化酶给予广泛的注意和积极的研究。这些年来，不仅固定化酶有关的文章和专利逐年急剧增加，而且又有几种固定化酶获得大规模的工业应用。例如，固定化青霉素酰胺酶生产6-氨基青霉烷酸，固定化葡萄糖异构酶生产高果糖浆，固定化乳糖酶处理乳清素和固定化谷氨酸脱羧酶由L-谷氨酸生产 γ -氨基丁酸等等。某些固定化酶已用于分析和临床化验，固定化酶用于医疗和人工器官亦已初见成效。

固定化细胞是七十年代迅速发展起来的技术，它沿用了固定化酶的方法，是工业应用酶或酶系的一条捷径。固定化细胞的技术适用于胞内酶，可免去破碎细胞提取酶的手续；酶在细胞内保持原始状态，酶的稳定性比较好；反应的范围较广，可用于多酶反应；此外，亦具有连续使用的优点。一些古典发酵是利用木片、石砾等以供微生物的繁育，就广义而言，也是一种固定化的方法。例如用于污水处理的淋滤器，生物转盘等利用生物膜的发酵方法，由来已久，可见固定化细胞的应用并不是一种新方法，只不过由于

现代科学的发达，固定化细胞的制备方法和应用范围都有很大改进。1973年千畑一郎等首先成功地在工业上应用固定化细胞连续生产L-天门冬氨酸。此后研究范围日益扩大，应用固定化细胞由延胡索酸生产L-苹果酸，由葡萄糖生产高果糖浆亦实现了工业生产。目前，固定化细胞应用的发展速度已超过了固定化酶。一些国家在大规模工业生产高果糖浆中大多是采用固定化细胞的反应器。

很多化合物的合成不只是一种酶催化的反应，而是多种酶参与的反应。并且多酶反应系统常需要供给能量的高能磷酸化合物（如三磷酸腺苷即ATP）和氧化还原酶的辅酶。如果将多种固定化酶和供应ATP或辅酶的再生反应器组合在一起进行多酶反应，这在经济效果和反应效率上都是有困难的，技术上亦有很多困难，而固定化细胞用于多酶反应要方便得多。固定化细胞可以通过热、酸和化学处理等控制副反应以进行单种酶的催化反应，亦可直接利用固定化细胞中的酶系进行多酶反应，尤其是利用固定化增殖细胞（即固定化后仍能生长繁殖的细胞，亦称固定化活细胞）可以进行需要ATP和辅酶的多酶反应。因为固定化细胞对结构复杂、化学合成困难的化合物的生产特别有用，所以近年来已成为酶工程研究中引人注目的领域。并且用固定化细胞已进行了不少有用化合物的试生产，包括有机酸、氨基酸、抗生素和辅酶等。例如固定化产氨短杆菌可以通过五步酶反应连续合成辅酶A。1983年在英国伦敦召开的生物工程会议上，日本人小田等介绍了用海藻酸钙和光交联树脂两种方法固定化酵母的增殖细胞连续生产酒精的研究报告，他们在试验工厂中用4千升的流动柱床反应器，以甘蔗糖蜜生产酒精，在柱反应器流

出液中酒精浓度可达到8.5~9.0%，每千升的反应器每天能生产纯酒精600升，酒精的转化率达到理论值的95%，生产能力超过常规分批式发酵工艺的20倍。用海藻酸钙包埋的酵母工作稳定性达4个月以上，用光交联树脂固定的酵母细胞工作稳定性达2年以上。固定化增殖酵母细胞用于连续化生产酒精的工艺目前已由实验室转到实验工厂，看来实现工业化生产是很有希望的。固定化增殖细胞用于处理废水现在已经达到工业应用的水平。

综上所述，酶的工业应用经过了本世纪以来，特别是近20年的发展，已经形成了自己独立的技术体系。固定化技术、反应器和控制系统的应用已具有工业规模，从而发展成为技术科学中的一个新的分支——酶工程。

第三节 我国酶工程的概况

我国酶制剂的生产和应用主要是在解放后逐渐发展起来的。早期从动物脏器提取胃蛋白酶和胰蛋白酶，从麦芽提取淀粉酶用作消化剂或其它用途。五十年代初，曾有一些科研单位对微生物酶的生产和应用作了探索。到五十年代末和六十年代初， α -淀粉酶和蛋白酶的生产及其应用取得了不少成果，如 α -淀粉酶用于棉布退浆和酒精生产，蛋白酶用于蛋白胨制造和皮革工业上脱毛等等。1965年在无锡建立了酶制剂厂开始了微生物酶制剂的商品生产。从此我国的酶制剂生产和应用发展较快，至今全国已经研究或生产的酶有30多种，除用途广泛的淀粉酶、糖化酶和蛋白酶已大量生产外，葡萄糖异构酶亦已占有重要地位。此外，脂肪酶、纤维素酶、葡萄糖氧化酶、果胶酶、异淀粉酶等研究亦取得了很好的进

展。天门冬酰胺酶、链激酶、尿激酶、溶菌酶及谷氨酸脱羧酶等试剂和医疗用酶都投入了生产。近几年,限制性核酸内切酶、核酸连接酶、聚合酶及其它基因工程用酶也陆续生产,酶制剂的生产 and 应用已经成为我国经济中不可缺少的一部分。这些为我国酶工程的研究和发展打下了基础。

我国从事固定化酶的研究开始于1970年。中国科学院上海生物化学研究所及微生物研究所相继把染料工业中使用的双功能试剂对- β -硫酸酯乙砒基苯胺引入固定化酶领域,它与多糖如甘蔗渣纤维、交联琼脂、葡聚糖凝胶等反应,得到各种带有苯胺基的载体,然后在十分温和的条件下与酶共价偶联。1972年,上海生物化学研究所用这类载体ABSE(对氨基苯磺酰乙基)-葡聚糖凝胶共价结合红酵母的3'-核糖核酸酶,生产3'-核苷酸试剂。我国科研工作者还用这类载体共价结合了多种酶。这些固定化酶都得到满意的结果,发展成为颇具我国特点的固定化方法。1977年底,上海生物化学研究所与江门甘蔗化工厂、上海啤酒厂协作将固定化5'-磷酸二酯酶用于5'-核苷酸的生产,这使世界上工业上实用的固定化酶又增添了新的一员。中国科学院微生物所用固定化多核苷酸磷酸化酶稳定地用于制备多聚核苷酸,已在1978年下半年进行了鉴定。

我国对固定化细胞的应用也进行了不少工作。上海生物化学研究所,上海第三制药厂和上海医药工业研究院用明胶戊二醛使具有青霉素酰胺酶活力的菌体固定化,装柱连续生产6-氨基青霉烷酸7个月,活力几乎不变,达到世界先进水平。中国科学院微生物研究所与太原制药厂协作也成功地用琼脂、戊二醛包埋大肠杆菌用于工业生产6-氨基青霉烷酸。

1978年12月化工部医药局对这二项工艺通过了鉴定。中国科学院微生物所于1977年和1979年分别用固定化菌体生产天门冬氨酸和苹果酸获得成功。近几年，不少单位采用固定化细胞和固定化酶生产高果糖浆的研究取得重要进展，已经完成中间试验，准备工业生产。

近年来，我国在辅酶的固定化、固定化酶在医疗和人工器官上的应用做了不少探索。

固定化酶在分析及亲和层析方面的应用也取得了一些进展。如华北制药厂用固定化青霉素酶对青霉素效价的测定；上海生物化学研究所用固定化5'-磷酸二酯酶和固定化碱性磷酸单酯酶进行寡核苷酸序列分析；北京大学曾试用固定化酶提纯胰蛋白酶抑制剂等等。

以上这些工作，为我国固定化酶的研究和应用打下了良好的基础。近年来有更多的单位从事酶工程的研究，已形成一支相当大的研究队伍，取得很多新的成果。

第二章 酶的概述

生物体内不断地进行着各种化学变化。例如，植物利用太阳能可以把二氧化碳和水转变成糖类，并放出氧气。而其它生物又能分解植物合成的各种有机物，并从中取得能量。如动物以植物体中的淀粉等复杂物质为食物，淀粉被分解成葡萄糖，并又进一步分解成二氧化碳和水，同时还为动物的生长、发育、运动等各种生命活动提供能量。这一切变化都是在常温、常压的条件下于细胞中进行的。生物体内的化学变化如此复杂，但却进行得极为顺利和迅速。如果我们用这些物质在试管中进行上述反应，是十分困难的。生物体内为什么具有促使这些变化加快的能力？是什么物质在细胞中起着这样奇特的作用？人们在长期的生活、生产实践和科学实验中逐步认识到，是由于在生物体内普遍有一种生物催化剂——酶。

我国劳动人民在四千多年以前的夏禹时期，已经开始酿酒业，周代的饴糖制作实际上都是对酶の利用。不过，由于科学水平的限制，当时还不可能懂得这就是酶的作用。直到一百多年以前，人们才从显微镜下看到了面团中的活的酵母菌，知道酵母从空气中进入面团后分泌出一种物质，使面团中部分淀粉变成酒精并产生二氧化碳气体。二氧化碳在面团中形成气泡，使面发起来了。1878年，人们把活酵母分泌出来的这种物质叫做酵素。以后又把这一类在化学变化中只

起加速反应，本身并不发生变化的生物催化剂统称为酶。

第一节 酶的本质

本世纪初，对酶的化学本质仍一无所知。1926年，当一位名叫萨姆莱的科学家宣称他分离到的脲酶是一种结晶的蛋白质时，人们仍然是半信半疑。以后，越来越多的研究发现酶的确是蛋白质。到目前为止所发现的上千种酶中，不论在它们的结构组成或性质上都证明了，几乎无一例外地都是蛋白质。反之，蛋白质不一定是酶，只是那些具有催化功能的蛋白质，无论来源于动植物还是微生物，都可以称之为酶。

现在酶的化学本质为蛋白质已是无可置疑的。蛋白质是一种结构复杂的生物大分子，它最基本的结构单位是氨基酸。大约有20种氨基酸，氨基酸与氨基酸之间通过一种叫肽键的连接方式彼此连接起来。由于参与连接的氨基酸数目及排列顺序的变化，就形成了各种氨基酸数目、种类不同的长链，人们称为肽链。一种蛋白质可由一条或多条肽链组成。尽管组成蛋白质的氨基酸只有20种左右，但由于排列组合的方式各异，就可以构成连接顺序不同的肽链。肽链的卷曲或折叠又可形成各种空间构型的结构，这样就出现了多种多样的蛋白质。

酶具有与普通蛋白质相同的物理化学性质，一切能使蛋白质变性的因素，同样可以使酶变性而失去酶所特有的活性。

酶是一类生物大分子，其分子量大多在一万至二百万之间，属于球状蛋白，它们的多肽链折叠盘曲成各种特殊的立体结构。每一种酶都具有其独特的分子表面构型，这种独特的表面的构型使一种酶只能与一些特定的物质结合并进行催