

21世纪高等院校教材

生·物·工·程·系·列

郭 勇 编著

(第二版)

酶 工 程

ENZYME
ENGINEERING



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪高等院校教材——生物工程系列

酶 工 程

(第二版)

郭 勇 编著

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是在1994年郭勇主编的《酶工程》的基础上,根据国内外酶工程的最新进展,结合作者的教学实践和科研成果,重新编写而成。本书主要介绍酶的生产和应用的基本理论、基本技术及其最新进展和发展趋势,内容包括绪论,微生物发酵产酶,动植物细胞培养产酶,酶的提取与分离纯化,酶分子修饰,酶、细胞和原生质体固定化,酶的非水相催化,酶反应器和酶的应用共9章。

本书可供高等院校生物工程、生物化工、酶工程、发酵工程、生物技术、生物科学等专业的研究生和本科生作为教材使用。也可供有关专业的教学工作者、科学工作者和工程技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

酶工程/郭勇编著. —2版. —北京:科学出版社, 2004

21世纪高等院校教材·生物工程系列

ISBN 7-03-013510-5

I. 酶… II. 郭… III. 酶-生物工程 IV. Q814

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第061377号

责任编辑:周辉 乐俊河/责任校对:钟洋

责任印制:安春生/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1994年8月第一版中国轻工业出版社

2004年8月第二版 开本: B5(720×1000)

2004年8月第一次印刷 印张: 20

印数: 1—3 500 字数: 321 000

定价: 28.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

第一版前言

根据 1990 年 5 月高等学校发酵工程专业教材委员会全体委员会议决定,为了适应学科发展的要求,新编《酶工程》,供发酵工程和相关专业的研究生或本科高年级学生作为教材使用。由郭勇负责主编,伦世仪担任主审。

本书的第一、二、三、四、五、八章由郭勇编写,第六、七章由莫开国编写。

在编写过程中,得到华南理工大学、无锡轻工业学院及各有关院校领导的关怀和支持,保证了编写工作的顺利进行。并承蒙有关专家、教授的热情支持和帮助,提供了不少的资料和宝贵意见,谨致衷心感谢。

由于酶工程是一门新兴的、发展神速的学科,往往书未印出,某些方面又有了新的进展。加上编者水平所限,不当之处,诚请读者批评指正。

编者
1993 年

第二版前言

本书是在 1994 年出版的《酶工程》的基础上,根据酶工程的最新进展和发展趋势,结合作者的教学实践和科研成果重新编写而成。

自本书第一版以来,已经过 10 年的时间,在这期间,本书在华南理工大学、江南大学等几十所高等院校作为相关专业研究生和本科生的教材使用,取得了良好的教学效果。

近 10 年来,酶工程作为生物工程的组成部分与生物工程的其他领域(基因工程、细胞工程、发酵工程等)一起飞速发展,在理论研究和应用研究方面均取得了巨大成果。为了更全面、系统地反映酶的生产和应用的基本理论、基本技术及其最新进展和发展趋势,笔者对第一版内容进行了较大的修改和补充。由原来的 8 章扩展到现在的 9 章。新增加了动、植物细胞培养产酶和酶的非水相催化两章,由于酶反应动力学在酶学和生物化学中都有详细介绍,所以不再作为一章单独列出,而将与酶工程关系密切的有关反应动力学内容在第一章中作简明介绍。除了新增加的章节以外,对原有章节的内容也作了较大的修改和补充。

酶工程是酶的生产与应用的技术过程,其主要任务是通过人工操作,获得人们所需的酶,并通过各种方法使酶发挥其催化功能。

酶的生产方法主要有提取分离法、生物合成法和化学合成法等。提取分离法是采用各种生化分离技术从含酶的动物、植物的组织、器官、细胞或微生物细胞中将酶提取出来,再经过分离纯化得到所需的酶,是酶生产中最早采用的方法,至今仍在使用。酶的分离纯化在用其他方法生产酶的过程中以及在酶学研究过程中,也是必不可少的环节。生物合成法是在人工控制条件的生物反应器中,通过微生物细胞、植物细胞或动物细胞的生命活动合成所需的酶的方法,是当今应用最广泛的方法,其中通过微生物的生命活动而获得所需酶的方法又称为发酵法,利用动、植物细胞培养可以生产得到有重要应用价值的各种酶,为酶的生产开辟了新的途径;化学合成法是采用化学方法合成所需的酶,由于要求所使用的氨基酸单体有很高的纯度,合成过程复杂,成本高,至今仍未能工业化生产。但是化学合成方法在酶分子修饰的研究、开发方面具有重要意义和使用价值。

酶是具有完整结构的生物大分子,具有专一性强、催化效率高、作用条件温和等显著特点,但是同时具有稳定性较差、活力较低、可能产生抗原性、通常游离酶只能一次性使用等弱点。为了在保持酶分子优点的同时克服酶分子在使用过程中的不足,开发了各种酶的特性改良技术,主要包括酶分子修饰技术、固定化技术以及

酶的非水相催化技术等。这些技术对酶的优化生产和高效应用起到促进作用,推动了酶工程的进一步发展。

酶的应用是酶工程的主要内容之一,通过酶的催化作用,可以得到人们所需要的物质或者将不需要的甚至有害的物质除去,以利于人体的健康、环境的保护、经济的发展和社会的进步。酶已经在医药、食品、轻工、化工、能源、环保等领域广泛应用。在酶的应用过程中,必须采用适宜的酶反应器,运用酶反应动力学的知识控制好酶催化反应的各种条件,使酶的催化作用达到预定的效果。

本书可供高等院校生物工程、酶工程、发酵工程、生物技术、生物化工等专业的师生作为教材使用。也可供有关专业的教学工作者、科学工作者和工程技术人员参考使用。

虽然第二版的内容有较多的更新,但是由于酶工程发展迅速,新的技术和方法不断涌现,加上编者水平所限,不当之处,诚请读者指正。

编著者

2004年3月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 酶的基本概念与发展史.....	1
第二节 酶催化作用的特点.....	3
一、酶催化作用的专一性强.....	3
二、酶催化作用的效率高.....	5
三、酶催化作用的条件温和.....	6
第三节 影响酶催化作用的因素.....	6
一、底物浓度的影响.....	6
二、酶浓度的影响.....	7
三、温度的影响.....	7
四、pH 值的影响.....	8
五、抑制剂的影响.....	8
六、激活剂的影响.....	10
第四节 酶的分类与命名.....	11
一、蛋白类酶(P 酶)的分类与命名.....	11
二、核酸类酶(R 酶)的分类与命名.....	15
第五节 酶的活力测定.....	17
一、酶活力测定方法.....	18
二、酶活力单位.....	19
三、酶的转换数与催化周期.....	19
四、固定化酶的活力测定.....	20
第六节 酶的生产方法.....	22
一、提取分离法.....	22
二、生物合成法.....	23
三、化学合成法.....	24
第七节 酶工程发展概况.....	25
第二章 微生物发酵产酶	29
第一节 酶生物合成的基本理论.....	30
一、RNA 的生物合成——转录.....	30
二、蛋白质的生物合成——翻译.....	33

三、酶生物合成的调节	37
第二节 常用的产酶微生物	45
一、细菌	46
二、放线菌	47
三、霉菌	47
四、酵母	49
第三节 发酵工艺条件及其控制	49
一、细胞活化与扩大培养	49
二、培养基的配制	50
三、pH 值的调节控制	53
四、温度的调节控制	54
五、溶解氧的调节控制	55
六、提高酶产量的措施	57
第四节 酶发酵动力学	60
一、酶生物合成的模式	60
二、细胞生长动力学	65
三、产酶动力学	66
第五节 固定化微生物细胞发酵产酶	68
一、固定化细胞发酵产酶的特点	68
二、固定化细胞发酵产酶的工艺条件及其控制	70
三、固定化细胞生长和产酶动力学	71
第六节 固定化微生物原生质体发酵产酶	74
一、固定化原生质体的特点	74
二、固定化原生质体发酵产酶的工艺条件及其控制	75
第三章 动、植物细胞培养产酶	76
第一节 植物细胞培养产酶	76
一、植物细胞的特性	77
二、植物细胞培养的特点	78
三、植物细胞培养的工艺条件及其控制	80
四、植物细胞培养产酶的工艺过程	86
第二节 动物细胞培养产酶	87
一、动物细胞的特性	88
二、动物细胞培养的特点	88
三、动物细胞培养的方式	88
四、动物细胞培养的工艺条件及其控制	90

五、动物细胞培养产酶的工艺过程·····	94
第四章 酶的提取与分离纯化 ·····	96
第一节 细胞破碎·····	96
一、机械破碎法·····	97
二、物理破碎法·····	97
三、化学破碎法·····	99
四、酶促破碎法·····	99
第二节 酶的提取·····	100
一、酶提取的方法·····	100
二、影响酶提取的主要因素·····	102
第三节 沉淀分离·····	103
一、盐析沉淀法·····	103
二、等电点沉淀法·····	105
三、有机溶剂沉淀法·····	106
四、复合沉淀法·····	106
五、选择性变性沉淀法·····	106
第四节 离心分离·····	107
一、离心机的选择·····	107
二、离心方法的选用·····	108
三、离心条件的确定·····	110
第五节 过滤与膜分离·····	112
一、非膜过滤·····	112
二、膜分离技术·····	114
第六节 层析分离·····	116
一、吸附层析·····	117
二、分配层析·····	120
三、离子交换层析·····	122
四、凝胶层析·····	125
五、亲和层析·····	129
六、层析聚焦·····	132
第七节 电泳分离·····	134
一、纸电泳·····	135
二、薄层电泳·····	135
三、薄膜电泳·····	136
四、凝胶电泳·····	136

五、等电点聚焦电泳	140
第八节 萃取分离	142
一、有机溶剂萃取	142
二、双水相萃取	143
三、超临界萃取	145
四、反胶束萃取	147
第九节 结晶	149
一、盐析结晶法	150
二、有机溶剂结晶法	150
三、透析平衡结晶法	151
四、等电点结晶法	151
第十节 浓缩与干燥	151
一、浓缩	152
二、干燥	152
第五章 酶分子修饰	154
第一节 金属离子置换修饰	154
一、金属离子置换修饰的方法	155
二、金属离子置换修饰的作用	155
第二节 大分子结合修饰	156
一、大分子结合修饰的方法	156
二、大分子结合修饰的作用	158
第三节 酶分子的侧链基团修饰	160
一、氨基修饰	161
二、羧基修饰	162
三、巯基修饰	163
四、胍基修饰	163
五、酚基修饰	164
六、咪唑基修饰	164
七、吡啶基修饰	164
八、分子内交联修饰	165
第四节 肽链有限水解修饰	166
第五节 核苷酸链剪切修饰	167
第六节 氨基酸置换修饰	168
一、氨基酸置换修饰的作用	168
二、氨基酸置换修饰的方法	168

第七节 核苷酸置换修饰·····	170
第八节 酶分子的物理修饰·····	172
第九节 酶分子修饰的应用·····	172
一、在酶学研究方面的应用·····	173
二、在医药方面的应用·····	174
三、在工业方面的应用·····	175
四、在抗体酶研究开发方面的应用·····	176
五、在核酸类酶人工改造方面的应用·····	177
六、在有机介质酶催化反应中的应用·····	178
第六章 酶、细胞、原生质体固定化 ·····	179
第一节 酶固定化·····	180
一、酶的固定化方法·····	181
二、固定化酶的特性·····	186
三、固定化酶的应用·····	188
第二节 细胞固定化·····	192
一、细胞固定化的方法·····	192
二、微生物细胞固定化·····	195
三、植物细胞固定化·····	197
四、动物细胞固定化·····	200
第三节 原生质体固定化·····	203
一、原生质体的制备·····	203
二、原生质体固定化·····	204
三、固定化原生质体的特点·····	205
四、固定化原生质体的应用·····	205
第七章 酶的非水相催化 ·····	207
第一节 酶非水相催化的研究概况·····	207
一、有机介质中的酶催化·····	207
二、气相介质中的酶催化·····	207
三、超临界流体介质中的酶催化·····	208
四、离子液介质中的酶催化·····	208
第二节 有机介质中水和有机溶剂对酶催化反应的影响·····	209
一、有机介质反应体系·····	209
二、水对有机介质中酶催化的影响·····	210
三、有机溶剂对有机介质中酶催化的影响·····	212
第三节 酶在有机介质中的催化特性·····	214

一、底物专一性	214
二、对映体选择性	215
三、区域选择性	215
四、键选择性	216
五、热稳定性	216
六、pH 值特性	217
第四节 有机介质中酶催化反应的条件及其控制	218
一、有机介质中酶催化反应的类型	218
二、酶的选择	221
三、底物的选择和浓度控制	221
四、有机溶剂的选择	222
五、水含量的控制	223
六、温度控制	223
七、pH 值的控制	224
第五节 有机介质中酶催化的应用	225
一、手性药物的拆分	225
二、手性高分子聚合物的制备	227
三、酚树脂的合成	228
四、导电有机聚合物的合成	229
五、发光有机聚合物的合成	229
六、食品添加剂的生产	230
七、生物柴油的生产	232
八、多肽的合成	232
九、甾体转化	233
第八章 酶反应器	234
第一节 酶反应器的类型	234
一、搅拌罐式反应器	235
二、填充床式反应器	236
三、流化床反应器	237
四、鼓泡式反应器	238
五、膜反应器	238
六、喷射式反应器	240
第二节 酶反应器的选择	240
一、根据酶的应用形式选择反应器	241
二、根据酶反应动力学性质选择反应器	242

三、根据底物或产物的理化性质选择反应器	244
第三节 酶反应器的设计	244
一、确定酶反应器的类型	244
二、确定酶反应器的制造材料	244
三、进行热量衡算	245
四、进行物料衡算	245
第四节 酶反应器的操作	248
一、酶反应器操作条件的确定及其调控	248
二、酶反应器操作的注意事项	251
第九章 酶的应用	254
第一节 酶在医药方面的应用	254
一、酶在疾病诊断方面的应用	255
二、酶在疾病治疗方面的应用	262
三、酶在药物制造方面的应用	267
第二节 酶在食品方面的应用	275
一、酶在食品保鲜方面的应用	276
二、酶在食品生产方面的应用	277
三、酶在食品添加剂生产方面的应用	283
四、酶在改善食品的品质和风味方面的应用	287
第三节 酶在轻工、化工方面的应用	288
一、酶在原料处理方面的应用	288
二、酶在轻工、化工产品制造方面的应用	290
三、加酶增强产品的使用效果	293
第四节 酶在环境保护方面的应用	295
一、酶在环境监测方面的应用	295
二、酶在废水处理方面的应用	296
三、酶在可生物降解材料开发方面的应用	297
第五节 酶在生物技术领域的应用	297
一、酶在除去细胞壁方面的应用	297
二、酶在大分子切割方面的应用	299
三、酶在分子拼接方面的应用	302
主要参考文献	305

第一章 绪 论

酶是具有生物催化功能的生物大分子，按照其化学组成，可以分为蛋白类酶（P 酶）和核酸类酶（R 酶）两大类。蛋白类酶主要由蛋白质组成，核酸类酶主要由核糖核酸（RNA）组成。

各种动物、植物、微生物细胞在适宜的条件下都可以合成各种各样的酶。因此，人们可以采用适宜的细胞，在人工控制条件的生物反应器中生产各种所需的酶。

在一定的条件下，酶可催化各种生化反应。而且酶的催化作用具有催化效率高，专一性强和作用条件温和等显著特点，所以酶在医药、食品、轻工、化工、环保、能源和生物工程等领域广泛应用。

酶的生产与应用的技术过程称为酶工程。

酶工程的主要内容包括：微生物细胞发酵产酶、动植物细胞培养产酶，酶的提取与分离纯化，酶分子修饰，酶、细胞和原生质体固定化、酶的非水相催化、酶反应器和酶的应用。

酶工程的主要任务是经过预先设计，通过人工操作，获得人们所需的酶，并通过各种方法使酶充分发挥其催化功能的技术过程。

第一节 酶的基本概念与发展史

我们的祖先在几千年前就已经不自觉地利用酶的催化作用来制造食品和治疗疾病。据文献记载，我国在 4000 多年前的夏禹时代就已经掌握了酿酒技术，在 3000 多年前的周朝，就会制造饴糖、食酱等食品，在 2500 多年前的春秋战国时期，就懂得用麴来治疗消化不良等疾病。

然而，人们从 19 世纪 30 年代开始才真正认识酶的存在和作用。100 多年来，人们对酶的认识经历了一个不断发展、逐步深入的过程。

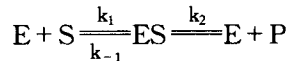
1833 年，佩恩（Payen）和帕索兹（Persoz）从麦芽的水抽提物中用乙醇沉淀得到一种可使淀粉水解生成可溶性糖的物质，称之为淀粉酶（diastase），并指出了它的热不稳定性，初步触及了酶的一些本质问题。

19 世纪中叶，巴斯德（Pasteur）对酵母的乙醇发酵进行了大量研究，认为在活酵母细胞内有一种可以将糖发酵生成乙醇的物质。1878 年，昆尼（Kunne）首次将酵母中进行乙醇发酵的物质称为酶（enzyme），这个词来自希腊文，意思

是“在酵母中”。

1896年, 巴克纳 (Buchner) 兄弟发现酵母的无细胞抽提液也能将糖发酵成乙醇。这就表明酶不仅在细胞内, 而且在细胞外也可以在一定的条件下进行催化作用。其后, 不少科技工作者对酶的催化特性和催化作用的理论进行了广泛的研究。

1902年, 亨利 (Henri) 根据蔗糖酶催化蔗糖水解的实验结果, 提出中间产物学说, 认为底物在转化成产物之前, 必须首先与酶形成中间复合物, 然后再转变为产物, 并重新释放出游离的酶。即:



1913年, 米彻利斯 (Michaelis) 和曼吞 (Menton) 根据中间产物学说, 推导出酶催化反应的基本动力学方程——米氏方程:

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

在这近 100 年中, 人们认识到“酶是生物体产生的具有生物催化功能的物质”。但是尚未搞清楚究竟是哪一类物质。1920年, 德国化学家威尔斯塔特 (Willstater) 将过氧化物酶纯化 12 000 倍, 酶活性很高, 但是检测不到蛋白质, 所以认为酶不是蛋白质。这是由于当时的检测技术较为落后所致。

1926年, 萨姆纳 (Sumner) 首次从刀豆提取液中分离纯化得到脲酶结晶, 并证明它具有蛋白质的性质。后来对一系列酶的研究, 都证实酶的化学本质是蛋白质。在此后的 50 多年中, 人们普遍接受了“酶是具有生物催化功能的蛋白质”这一概念。

1960年, 雅各 (Jacob) 和莫诺德 (Monod) 提出操纵子学说, 阐明了酶生物合成的基本调节机制。

1982年, 切克 (Cech) 等人发现四膜虫 (*Tetrahymena*) 细胞的 26 S rRNA 前体具有自我剪接功能 (self-splicing)。该 RNA 前体约有 6400 个核苷酸, 含有 1 个内含子 (intron) 或称为间隔序列 (intervening sequence, IVS) 和 2 个外显子 (exon), 在成熟过程中, 通过自我催化作用, 将间隔序列切除, 并使 2 个外显子连接成成熟的 RNA, 这个过程称为剪接。这种剪接不需要蛋白质存在, 但必须有鸟苷或 5'-GMP 和镁离子参与。切克将之称为自我剪接反应, 认为 RNA 亦具有催化活性, 并将这种具有催化活性的 RNA 称为核酸类酶。

1983年, 阿尔特曼 (Altman) 等人发现核糖核酸酶 P (RNase P) 的 RNA 部分 M1 RNA 具有核糖核酸酶 P 的催化活性, 可以在高浓度镁离子的存在条件下, 单独催化 tRNA 前体从 5' 端切除某些核苷酸片段成为成熟的 tRNA, 而该酶的蛋白质部分 C₅ 蛋白却没有酶活性。

RNA 具有生物催化活性这一发现，改变了有关酶的概念，被认为是最近 20 多年来生物科学领域最令人鼓舞的发现之一。为此，Cech 和 Altman 共同获得 1989 年度的诺贝尔化学奖。

20 多年来，新发现的核酸类酶越来越多。现在知道，核酸类酶具有自我剪接、自我剪切和催化分子间反应等多种功能，作用底物有 RNA、DNA、糖类、氨基酸酯等。研究表明，核酸类酶具有完整的空间结构和活性中心，有独特的催化机制，具有很高的底物专一性，其反应动力学亦符合米氏方程的规律。可见，核酸类酶具有生物催化剂的所有特性，是一类由 RNA 组成的酶。由此引出“酶是具有生物催化功能的生物大分子（蛋白质或 RNA）”的新概念。即，酶有两大类，一类主要由蛋白质组成，称为蛋白类酶（P 酶）；另一类主要由核糖核酸组成，称为核酸类酶（R 酶）。

第二节 酶催化作用的特点

酶是生物催化剂，与非酶催化剂相比，具有专一性强，催化效率高和作用条件温和等显著特点。

一、酶催化作用的专一性强

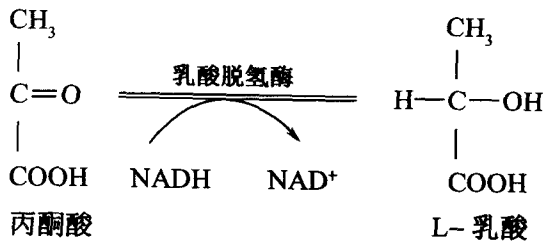
酶催化作用的专一性是酶最重要的特性之一。也是酶与其他非酶催化剂最主要的不同之处。细胞中有秩序的物质代谢规律，就是依靠酶的专一性来实现的。酶的专一性也是酶在各个领域广泛应用的重要基础。

酶的专一性是指在一定的条件下，一种酶只能催化一种或一类结构相似的底物进行某种类型反应的特性。

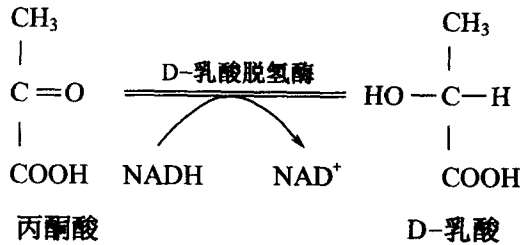
酶的专一性按其严格程度的不同，可以分为绝对专一性和相对专一性两大类。

1. 绝对专一性

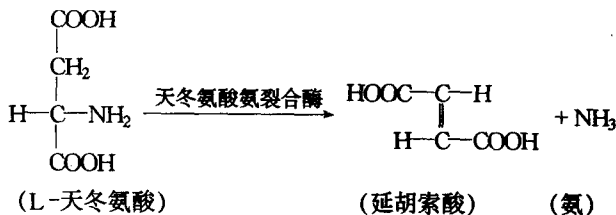
一种酶只能催化一种底物进行一种反应，这种高度的专一性称为绝对专一性。当酶作用的底物含有不对称碳原子时，酶只能作用于异构体的一种。这种绝对专一性称为立体异构专一性。例如，乳酸脱氢酶 [EC 1.1.1.27] 催化丙酮酸进行加氢反应生成 L-乳酸：



而 D-乳酸脱氢酶 [EC 1.1.1.28] 却只能催化丙酮酸加氢生成 D-乳酸:



绝对专一性的另一个典型例子是天冬氨酸裂合酶 [EC 4.3.1.1], 此酶仅仅作用于 L-天冬氨酸, 经过脱氨基作用生成延胡索酸 (反丁烯二酸) 及其逆反应:



而对 D-天冬氨酸和马来酸 (顺丁烯二酸) 一概不作用。

核酸类酶也同样具有绝对专一性。如四膜虫 26S rRNA 前体等催化自我剪接反应的 R 酶, 只能催化其本身 RNA 分子进行反应, 而对于其他分子一概不作用。

再如 L-19 IVS 是含有 395 个核苷酸的核酸类酶, 该酶催化底物 GGCCUCUAAAAA 与鸟苷酸 (G) 反应生成产物 GGCCUCU + GAAAAA。但是对寡核苷酸 GGCCUGUAAAAA 以及 GGCCCGUAAAAA 等一概不作用。

2. 相对专一性

一种酶能够催化一类结构相似的底物进行某种相同类型的反应, 这种专一性称为相对专一性。