

高等学校轻工专业试用教材

酶 工 程

郭 勇 主 编

中国轻工业出版社

高等学校轻工专业试用教材

酶 工 程

郭 勇 主 编

中国轻工业出版社

(京)新登字034号

内 容 简 介

本书主要阐述酶的生产和应用的基本理论和基本技术。内容包括：绪论，酶的发酵生产，酶的分离纯化，酶分子修饰，酶与细胞固定化，酶与固定化酶的反应动力学，酶反应器和酶的应用等八章。书末附有酶的分类和一些酶常用活力测定方法两个附录。

本书可作为高等院校发酵工程、生物化工、酶工程、生物工程和其他有关专业的研究生和本科高年级学生的教材。也可供有关专业的教学工作者、科学工作者及工程技术人员参考。

21130/07

高等学校轻工专业试用教材

酶 工 程

郭 勇 主编

责任编辑 唐是雯

*

中国轻工业出版社出版

(北京市东长安街6号)

三河宏达印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

*

850×1168毫米^{1/32}印张：10.5 字数：286千字

1994年5月 第1版第1次印刷

印数：1—4500 定价：6.00元

ISBN7-5019-1542-3/TS·1016

前 言

根据1990年5月高等院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。提供了不少资料和宝贵意见，谨此表示衷心感谢。

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

编者

目 录

第一章 绪论	1
第一节 酶的基本概念.....	1
第二节 酶工程发展概况.....	12
第三节 酶的生产方法.....	14
第四节 酶的应用前景.....	16
第二章 酶的发酵生产	18
第一节 酶生物合成的基本理论.....	20
第二节 酶发酵生产常用的微生物.....	29
第三节 发酵工艺条件及控制.....	33
第四节 酶发酵动力学.....	46
第五节 固定化细胞发酵产酶.....	57
第六节 动、植物细胞发酵产酶.....	63
第三章 酶的分离纯化	72
第一节 细胞破碎.....	72
第二节 酶的提取.....	77
第三节 离心分离.....	79
第四节 过滤与膜分离.....	87
第五节 沉淀分离.....	93
第六节 层析分离.....	103
第七节 电泳分离.....	116
第八节 酶的结晶.....	128
第九节 浓缩与干燥.....	131
第四章 酶分子修饰	135
第一节 金属离子置换修饰.....	135

第二节	大分子结合修饰·····	137
第三节	肽链有限水解修饰·····	141
第四节	酶蛋白侧链基团修饰·····	142
第五节	氨基酸置换修饰·····	145
第六节	物理修饰·····	148
第五章	酶与细胞固定化·····	149
第一节	酶和菌体固定化·····	151
第二节	微生物、植物和动物细胞固定化·····	166
第三节	原生质体固定化·····	177
第六章	酶与固定化酶的反应动力学·····	183
第一节	酶反应动力学·····	183
第二节	固定化酶反应动力学·····	209
第三节	各种因素的动力学分析·····	216
第四节	动力学参数的测定·····	225
第七章	酶反应器·····	229
第一节	酶反应器的特点与类型·····	229
第二节	酶反应器的设计与选型·····	237
第三节	酶反应器的操作·····	247
第八章	酶的应用·····	253
第一节	酶在轻工、食品方面的应用·····	253
第二节	酶在医药方面的应用·····	263
第三节	酶在分析检测方面的应用·····	276
第四节	酶在生物工程中的应用·····	280
附录一	酶的分类·····	291
附录二	一些酶常用活力测定方法·····	308
1.	α -淀粉酶的活力测定·····	308
2.	糖化酶的活力测定·····	311
3.	蛋白酶的活力测定·····	314
4.	脂肪酶的活力测定·····	317

5. 葡萄糖异构酶的活力测定	319
6. 果胶酶的活力测定	322
7. 碱性磷酸酶的活力测定	323
8. 葡萄糖氧化酶的活力测定	325

第一章 绪 论

酶是生物催化剂。

所有的生物体在一定条件下都可以合成多种多样的酶。生物体内的各种生化反应，几乎都是在酶的催化作用下进行的。故此，酶是生命活动的产物，又是生命活动必不可缺的条件之一。

酶的催化作用具有专一性强，催化效率高和反应条件温和等显著特点，已在食品、轻工、化工、医药、环保、能源和科研等各个领域得以广泛应用。

酶的生产和应用的技术过程称为酶工程。

酶工程的主要内容包括：酶的发酵生产，酶的分离纯化，酶分子修饰，酶和细胞固定化，酶反应动力学与反应器，酶的应用等方面。

酶工程的主要任务是：通过预先设计，经过人工操作控制而获得大量所需的酶，并通过各种方法使酶发挥其最大的催化功能。

第一节 酶的基本概念

早在几千年前，人类已开始利用微生物酶来制造食品和饮料。我国在 4000 多年前，就已经在酿酒、制酱、制饴等的过程中，不自觉地利用了酶的催化作用。然而，真正地认识酶的存在和作用，是从 19 世纪开始的。1833 年佩恩 (Payen) 和帕索兹 (Persoz) 从麦芽的水抽提物中，用酒精沉淀得到一种可使淀粉水解成可溶性糖的物质，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) 等人对酵母的酒精发酵进行了大量研究，指出酵母中存在一种使

葡萄糖转化为酒精的物质。1978年库尼 (Künne) 首先把这种物质称之为酶 (Enzyme), 这个词来自希腊文, 其意思是“在酵母中”。1896年巴克纳兄弟 (Büchner) 发现酵母的无细胞抽提液也能将糖发酵成酒精。这就表明酶不仅在细胞内, 而且在细胞外也可在一定条件下进行催化作用。其后, 对酶的催化作用理论和酶的本质进行了广泛的研究。1913年, 米彻利斯 (Michaelis) 和曼吞 (Menten) 提出中间产物学说, 推导出酶促反应的基本方程式——米氏方程 $v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$ (见 6-6 式)。

1926年, 萨姆纳 (Sumner) 首次从刀豆提取液中分离得到脲酶结晶, 证明它具有蛋白质的性质, 提出酶的化学本质是蛋白质的观点。此后, 对一系列酶的研究都一再证明了酶是具有生物催化特性的特殊蛋白质这一概念。然而, 近 10 年来的研究, 却发现除了蛋白质以外, 核糖核酸 (RNA) 也具有催化活性。例如, 1982年切克 (Cech) 等人在四膜虫 (*Tetrahymena*) 的 RNA 分子中发现一个具有自身切接功能的片段, 它可以从前体 RNA 中特异地把与它本身相同的 RNA 片段 (413 个核苷酸) 切下来, 然后把剩余的 RNA 部分重新连接起来。切下的片段环化成为具有催化活性的 RNA, 称之为核酸类酶 (Ribozyme), 或称为催化活性 RNA。1983年阿特曼 (Atman) 和佩斯 (Pace) 等人的研究表明, 核糖核酸酶 P (由 RNA 和蛋白质组成) 中的 RNA 组分, 能单独催化前体 tRNA 从 5'-末端切除某些核苷酸片段, 而成为成熟的 tRNA, 显示出该 RNA 组分具有核糖核酸酶的催化活性。

一、酶的专一性

酶是生物催化剂, 具有专一性强, 催化效率高和作用条件温和等显著特点。其中专一性是酶的最重要的特性, 是酶与其他非酶催化剂的最主要的不同之处。如果没有酶的专一性, 在细胞中

有秩序的物质代谢将不复存在，而且酶的应用将如同其他非酶催化剂那样受到局限。酶的专一性对酶工程的发展有重要意义。

酶的专一性是指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的反应。

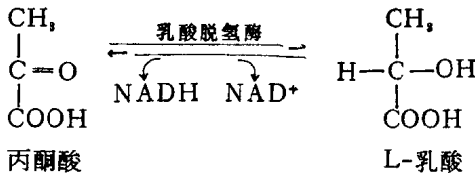
酶的专一性可以按其严格程度的不同，分为下列两大类。

1. 绝对专一性

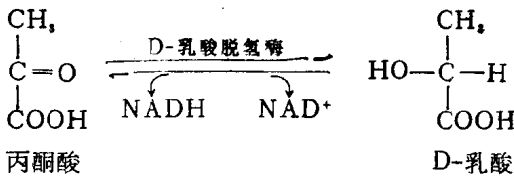
一种酶只能催化一种物质进行一种反应，这种高度的专一性称为绝对专一性。

当酶作用的底物或形成的产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。

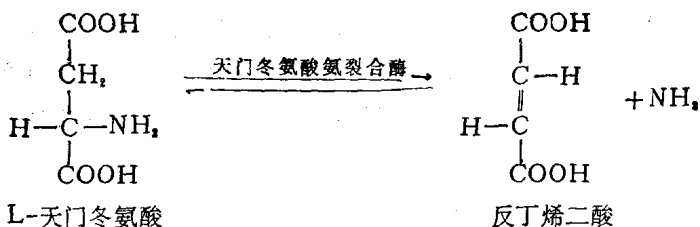
例如，乳酸脱氢酶〔EC1.1.1.27〕催化丙酮酸生成L-乳酸：



而D-乳酸脱氢酶〔EC1.1.1.28〕却只能催化丙酮酸生成D-乳酸：



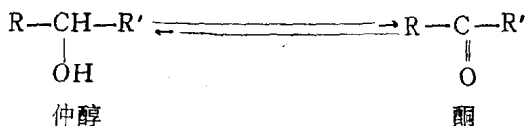
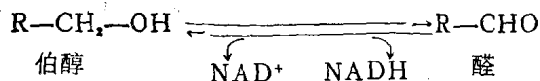
绝对专一性的另一个典型例子是天门冬氨酸氨裂合酶〔EC 4.3.1.1〕。此酶仅作用于L-天门冬氨酸，经脱氨基生成延胡索酸（反丁烯二酸）或其逆反应。而对D-天门冬氨酸或者马来酸（顺丁烯二酸）都一概不作用。其催化反应方程式如下所示：



2. 相对专一性

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

例如，醇脱氢酶〔EC1.1.1.1〕作用于伯醇和仲醇，进行脱氢反应，生成醛或酮：



又如，胰蛋白酶〔EC3.4.31.4〕选择性地水解含有赖氨酸或精氨酸的羰基的键。故此，凡是含有赖氨酸或精氨酸羰基的酰胺、酯和肽都能被该酶迅速地水解。

3. 酶的专一性的确定

酶的专一性是酶的最基本的概念之一。也是酶的应用方面的基础，对任何一种酶的研究和应用都离不开对酶的专一性的了解。

确定某种酶的专一性有好几个步骤，首先要选择一种该酶可催化的物质作为该酶的作用底物，通过试验确定其最适的pH值、温度等反应条件；其次是试验底物浓度对反应速度的影响，确定其米氏常数 K_m ；然后用其他有可能是该酶作用底物的物质，在相同的条件下逐个进行试验，有时要在不同的条件下逐个试验，观察是否有催化反应发生，从而确定该酶是属于绝对专一性还是相

对专一性。

对于相对专一性的酶，可作用于一类物质。可以选择几种有代表性的底物，求出各自的 K_m 值。在某些情况下，不同的底物有不同的最适 pH 值，而 pH 值对 K_m 有一定的影响。此时必须作出不同底物各自的 pH 曲线。然后再在各自的最适 pH 值条件下进行试验，以确定各底物相应的 K_m 值。

在进行酶的专一性试验时，所使用的酶和各种底物都要尽可能地纯。对于有不对称碳原子的物质，应分别对不同的光学异构体进行试验。

二、酶的分类与命名

现在已知的酶近 3000 种。为了准确地识别某一种酶，免致发生混乱和误解，在酶学研究和酶工程领域，要求对每一种酶都要有准确的名称和明确的分类。为此，国际酶学委员会 (International Commission of Enzymes) 做了大量的工作。

国际酶学委员会成立于 1956 年，受国际生物化学联合会 (International Union of Biochemistry) 及国际理论化学和应用化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry) 领导。该委员会一成立，第一件事就是着手研究当时混乱的酶的名称问题。在当时，酶的命名没有一个准则。由酶的发现者或其他研究者个人的意见给酶定名，必然引起混乱。有时，同一种酶有两个或多个不同名称。例如，催化淀粉水解生成糊精的酶，就有淀粉酶 (Diastase)、液化淀粉酶 (Liquefacient Amylase)、糊精淀粉酶 (Dextrine Amylase) 和 α -淀粉酶 (α -Amylase) 等多个名称。相反，有时同一个名称却用以表示两种或多种不同的酶。例如，琥珀酸氧化酶 (Succinate Oxidase) 这一名称，曾经用于琥珀酸脱氢酶 (Succinate Dehydrogenase)，琥珀酸半醛脱氢酶 (Succinate-Semialdehyde Dehydrogenase) 和 NAD(P)^+ 琥珀酸半醛脱氢酶 (Succinate-Semialdehyde De-

hydrogenase(NAD(P)⁺) 等几种酶。有些酶的名称则很少或者毫不表达该酶所催化的反应的本质。例如，触酶(Catalase)，黄酶(Yellow enzyme)、间酶(Zwischen ferment)等，而高峰淀粉酶(Taka-diastrase)这一名称，则来自日本学者高峰让吉的姓氏(高峰在日语中发音为 Takamine)，他于1894年首次从米曲霉中制备得到一种淀粉酶制剂，用作消化剂。由此可见，确立酶的分类和命名原则，在当时是亟待解决的难题。

国际酶学委员会于1961年在“酶学委员会的报告”中提出了酶的分类与命名方案。此方案获得了“国际生物化学联合会”的批准。此后，分别于1964年，1972年，1978年，1984年进行过修订和补充。随着每一次修订，在不断完善的同时间，酶的数量也不断增加。如下表所示：

年 份	酶总数	文 献 名 称
1961	712	Report of Enzyme Commission
1964	875	Enzyme Nomenclature(1964)
1972	1770	Enzyme Nomenclature(1972)
1978	2122	Enzyme Nomenclature(1978)
1984	2728	Enzyme Nomenclature(1984)

酶的分类与命名的基础是酶的专一性。

根据国际酶学委员会的建议，每种具体的酶都有其推荐名和系统命名。推荐名是在惯用名称的基础上，加以选择或稍加修改而成。酶的推荐名由两部分组成：1. 底物的名称，2. 催化反应的类型，后加一个“酶”字(-ase)。例如，葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase)，表明该酶作用的底物是葡萄糖，催化的反应类型属于氧化反应。而对于水解酶类，催化的为水解反应，在命名时可以省去说明反应类型的“水解”字样，只在底物名称后加上“酶”字即可。例如，淀粉酶，表明该酶催化淀粉水解；乙酰胆碱酶，

表明其催化乙酰胆碱进行水解反应等等。

酶的系统命名则更详细、更准确地反映出该酶所催化的反应。系统命名包括了酶作用的底物，酶作用的基团及催化反应的类型。例如，上述葡萄糖氧化酶的系统命名为：“ β -D-葡萄糖，氧 1-氧化还原酶”，表明该酶所催化的反应系以 β -D-葡萄糖为脱氢的供体，以氧为氢受体，催化作用在第一位碳原子基团上进行，所催化的反应属氧化还原反应，故该酶属氧化还原酶。

系统命名法根据酶所催化的反应类型，将酶分成 6 大类。即第 1 类，氧化还原酶；第 2 类，转移酶；第 3 类，水解酶；第 4 类，裂合酶；第 5 类，异构酶；第 6 类，合成酶（或称连接酶）。每一种酶都有其一定的系统编号。系统编号采用四码编号方法。第 1 个号码表示该酶属于 6 大类中的某一类，第 2 个号码表示该酶属于该类中的某一亚类，第 3 个号码表示属于该亚类中的某一小类，第 4 个号码表示这一具体的酶在该小类中的序号。每个号码之间用圆点(·)分开。例如，葡萄糖氧化酶的系统编号为 [EC 1.1.3.4]。其中 EC 表示国际酶学委员会 (Enzyme Commission)；第 1 个号码“1”表示该酶属氧化还原酶类；第 2 个号码“1”表示属氧化还原酶类中的第一亚类，该亚类所催化的反应系在供体的 CH—OH 基团上进行；第 3 个号码“3”表示该酶属第 1 亚类中的第 3 小类，该小类的酶所催化的反应系以氧为氢受体的；第 4 个号码“4”就是该酶在小类中的特定序号。酶的分类及编号请参看附录一。

三、酶的活力测定

在酶的生产及应用过程中，经常要进行酶的活力测定，以确定酶量的多少及其变化情况。

酶活力是指在一定条件下，酶所催化的反应速度。反应速度越大，意味着酶活力越高。

酶催化反应速度，用单位时间内底物的减少量或产物的增加

量表示。即：

$$v = -\frac{ds}{dt} = \frac{dp}{dt}$$

1. 酶活力测定方法

酶活力测定方法多种多样。总的要求是快速、简便、准确。

酶活力测定均包括两个阶段。首先要在一定的条件下，酶与其作用底物反应一段时间，然后再测定反应液中底物或产物变化的量。一般采取如下步骤：

(1) 根据酶的专一性，选择适宜的底物，并配制成一定浓度的底物溶液。要求所使用的底物均匀一致，达到一定的纯度。有些底物溶液要求新鲜配制，有些则可预先配制后置冰箱保存备用。

(2) 根据资料或试验结果，确定酶促反应的温度，pH 值等条件。温度可选在室温 (25℃)，体温 (37℃)，酶反应最适温度，或其他选用的温度。pH 值应是酶促反应的最适 pH 值。反应条件一经确定，在反应过程中应尽量保持恒定不变。故此，反应要在恒温槽中进行，pH 值的保持是采用一定浓度和一定 pH 值的缓冲溶液。有些酶促反应，要求激活剂等其他条件，应适量添加。

(3) 在一定的条件下，将一定量的酶液与底物溶液混合均匀，适时记下反应开始的时间。

(4) 反应到一定的时间，取出适量的反应液运用各种生化检测技术，测定产物的生产量或底物的减少量。为了准确地反映酶促反应的结果，应尽量采用快速、简便的方法，立即测出结果。若不能立即测出结果的，则要及时终止酶反应，然后再测定。终止酶反应的方法很多。常用的有：① 反应时间一到，立即取出适量的反应液，置于沸水浴中，加热使酶失活；② 立即加入适宜的酶变性剂，如三氯醋酸等，使酶变性失活；③ 加入酸或碱溶液，使反应液的 pH 值迅速远离酶催化反应的最适 pH，从而终止反应；④ 将取出的反应液立即置于冰粒堆中，或冰盐溶液中，使反应液的温度迅速降低至 10℃ 以下等等。究竟采用何种方法终止反

应，要根据酶的特性，反应底物或产物的性质以及检测方法等加以选择。

测定反应液中物质的变化量，可采用光学检测法，化学检测法等生化检测技术。例如，用分光光度法测定碱性磷酸酶催化硝基酚磷酸（NPP）水解生成的对硝基酚的量；用化学滴定法测定糖化酶催化淀粉水解生成的葡萄糖的量等等。一种酶可能有多种测定方法，要根据实际情况选用。请参阅附录二。

2. 酶活力单位

酶活力的高低，是以酶活力单位数来表示的。为此，需首先对酶的活力单位下一个确切的定义。

世界各地实际应用的酶活力单位的定义各不相同。同一种酶往往有几种不同的单位。为统一起见，1961年，国际生物化学联合会规定：在特定条件下（温度可采用 25℃ 或其他选用的温度；pH 等条件均采用最适条件），每 1min 催化 1 μ mol 的底物转化为产物的酶量定义为 1 个活力单位。这个单位称为酶的国际单位（IU）。例如：糖化酶活力测定时，在 pH4.6，温度为 40℃ 的条件下，每 1min 催化可溶性淀粉水解生成 1 μ mol 葡萄糖的酶量定义为 1 个活力单位。

为了比较酶制剂的纯度和活力的高低，常常采用比活力这一概念。酶的比活力是指在特定的条件下，每 1mg 酶蛋白所具有的酶活力单位数。即：

$$\text{酶比活力} = \text{酶活力(单位)} / \text{mg酶蛋白}$$

有时也采用每 1(m) L 酶液或每 g 酶制剂的活力单位数表示酶的比活力。

3. 固定化酶的活力测定

与水不溶性载体结合，在一定的空间范围内起催化作用的酶称为固定化酶。固定化酶的性质与游离酶有一些区别。所以固定化酶的活力测定与游离酶活力测定方法也有一些不同。

现将常用的固定化酶活力测定方法介绍如下：

(1) 振荡测定：称取一定重量的固定化酶，放在一定形状，一定大小的容器中，加入一定量的底物溶液，在特定的条件下，一边振荡或搅拌，一边进行催化反应。经过一定时间，取出一定量的反应液进行测定。

固定化酶反应液的测定方法与游离酶反应液的测定方法完全相同。但在固定化酶反应时，振荡或搅拌速度对反应速度有很大影响。在振荡或搅拌速度不高时，反应速度随振荡或搅拌速度的增加而升高，在达到一定水平后不再升高。若振荡或搅拌速度过大，可能引起固定化酶的结构破坏，缩短固定化酶的使用寿命。所以固定化酶反应要在一定的振荡或搅拌速度下进行，过大过小都对反应速度有明显影响。此外，底物浓度，pH值，温度，反应时间等条件可与游离酶活力测定的条件相同。也可根据固定化酶的特性不同而选用适宜的条件。最好与实际应用的工艺条件相同的条件下进行测定。

(2) 柱法测定：将一定量的固定化酶装进具有恒温装置的反应柱中，让条件适宜的底物溶液，以一定的速率流过酶柱，收集流出的反应液。按常规方法测定底物的消耗量或产物的生成量。测定方法与游离酶反应液的测定方法相同。然而反应液流经酶柱的速度对反应速度有很大的影响。在不同的流速条件下，反应速度不同。在某一最适流速下，反应速度最大。所以，测定固定化酶活力要在固定的流速条件下进行。而且酶柱的形状和径高比都对反应速度有明显影响。所有这些条件都必须固定不变。此外，底物浓度，反应温度，pH值，反应时间，离子强度等条件可以与游离酶活力测定时相同，也可按固定化酶的最适条件。最好能与实际应用时的工艺条件相同。

(3) 连续测定：利用连续分光光度法等方法可对固定化酶反应液进行连续测定，从而连续测定酶活力。测定时，可将振荡反应器中的反应液用泵连续引到连续测定仪（例如，双束紫外分光光度计等）的流动比色杯中进行连续分光测定。或者使固定化