

GU DING HUAMEI
LI LUN YU YING YONG

陈驹声 居乃琥 陈石根 编著

固定化酶理论与应用

内 容 提 要

本书理论与应用并重，分为四章：第一章，固定化酶催化的反应动力学；第二章，酶反应器；第三章，酶及细胞的固定化方法；第四章，固定化酶与固定化细胞的应用。

本书可供从事生物工程的技术人员参考，也可供大专院校有关专业的师生阅读。

固定化酶理论与应用

陈驹声 居乃琥 陈石根 编著

轻工业出版社出版

(北京广安门南滨河路25号)

轻工业出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

787×1092毫米1/32 印张：12¹/₂ 字数：270千字

1987年3月 第一版第一次印刷

印数：1—4,000 定价：2.65元

统一书号：15042·2091

序

举世瞩目的生物工程，在我国已列入国家重点科研项目之一。生物工程范围很广，而酶工程则居其一。酶工程以固定化酶为主要内容，它的历史远在本世纪初期，但应用于工业生产还是近在六十年代之事。

我国于七十年代开始固定化酶的研究，应用5'-磷酸二酯酶（核酸酶P₁）由核糖核酸生产单核苷酸，应用青霉素酰化酶由青霉素制造6-APA，应用葡萄糖异构酶由葡萄糖生产果葡糖浆等，均已采用酶的固定化技术。应用固定化酵母细胞生产啤酒及酒精，也取得可喜效果。现在酶工程学科受到全国有关单位的普遍重视。

本书分为四章：第一章，固定化酶催化的反应动力学；第二章，酶反应器；第三章，酶及细胞的固定化方法；第四章，固定化酶与固定化细胞的应用。内容理论与应用并重，可供从事微生物工作的技术人员参考。

本书第一、二两章由陈石根同志编写，第三章由笔者编写，第四章由居乃琥同志编写，最后由笔者整理补充成书。在编写过程中，承沈永强、刘慈俊、袁中一、刘树镗诸同志赞助与鼓励，马瑞德同志提供辐照在包埋法的应用资料，特此致谢！

陈驹声

前 言

固定化酶是二十世纪六十年代开始发展起来的一项新技术。最初主要是将水溶性酶与不溶性载体结合起来，成为不溶于水的酶的衍生物，所以也曾叫过“水不溶酶” (water-insoluble enzyme) 和“固相酶” (solid phase enzyme)。但是，后来发现，也可以将酶包埋在凝胶内或置于超滤装置中，高分子底物与酶在超滤膜一边，而反应产物可以透过膜逸出，在这种情况下，酶本身仍是可溶的，只不过被固定在一个有限的空间内不再能自由流动罢了。因此，用水不溶酶或固相酶的名称就不恰当了。在1971年第一届国际酶工程 (enzyme engineering) 会议上，正式建议采用“固定化酶” (immobilized enzyme) 的名称。

从六十年代起，固定化酶研究的发展很快，出现了大量综述和专著。在固定化酶研究的初期，人们主要集中于各种制备方法的研究。近年来，人们的注意力已开始转向固定化酶与固定化细胞在工业、医学、化学分析、亲和层析、环境保护、能源开发以及理论研究等方面的应用研究。目前已经取得了许多重要成果，发挥了巨大作用。

固定化酶与水溶性酶相比，具有下列优点：（1）极易将固定化酶与底物、产物分开；（2）可以在较长时间内进行反复分批反应和装柱连续反应；（3）在大多数情况下，可以提高酶的稳定性；（4）酶反应过程能够加以严格控制；（5）产物溶液中没有酶的残留，简化了提纯工艺；（6）较水溶性酶更适合于多酶反应；（7）可以增加产物

的收得率。提高产物的质量；（8）酶的使用效率提高，成本降低。与此同时，固定化酶也存在一些缺点：（1）固定化时，酶活力有损失；（2）增加了固定化的成本，工厂开始投资大；（3）只能用于水溶性底物，而且较适用于小分子底物，对大分子底物不适宜；（4）与完整菌体相比，不适宜于多酶反应，特别是需要辅助因子的反应；（5）胞内酶必须经过酶的分离手续。

在固定化酶基础上发展起来的固定化细胞，近来更受到人们的重视，它具有很多优点：例如，（1）省去酶的分离费用；（2）多酶系统，无需辅酶的再生；（3）细胞生长停滞时间短；（4）细胞多，反应快；（5）对污染的抵抗力强；（6）可以连续发酵；（7）蒸馏或提取前不用分去细胞；（8）保持酶的原始状态，从而加强了稳定性；（9）单批发酵的细胞只用一次即行排弃，而固定化细胞可以连续使用，因此生长细胞耗用养料大为节约；（10）使用固定化细胞反应塔，一边进入培养基，一边排出发酵液，可能避免反馈抑制和产物的消耗。当然，固定化细胞也存在一些缺点：例如，（1）必须保持菌体的完整，防止菌体自溶，否则会影响产物的纯度；（2）必须抑制细胞内蛋白酶对所需酶的分解作用；（3）细胞内有多种酶存在，会形成副产物；为防止形成副产物，必须抑制其他酶的活力；（4）细胞膜或细胞壁会造成底物渗透和扩散的障碍。

人们在实际应用中，充分发挥了固定化酶和固定化细胞在改革工艺和降低成本方面的巨大潜力，收到了很好的效果。很多人把固定化酶称为“长效的酶”、“无公害催化剂”等。目前，很多国家的政府和企业部门都非常支持固定化酶和固定化细胞理论与应用的研究。生物化学、微生物学、化

学工程、有机化学、高分子化学、物理化学和医学等各个学科的科技人员和工厂企业的技术人员都非常重视这方面的研究工作。从1971年起 已经正式形成了酶工程的新学科。

酶工程主要研究酶在工业、医学等各个领域中的应用。目前除第一代酶——酶制剂——仍在发展中外，第二代酶——固定化酶——已正在登上历史舞台，一些固定化酶已经在各方面得到广泛的应用。第三代酶，即包括辅助因子再生系统在内的固定化多酶反应器正在迅速发展着，不久将能用于工业生产并必将引起发酵工业和化学合成工业的巨大变革。

目 录

第一章 固定化酶催化的反应动力学

一、均相系统的某些化学反应动力学关系·····	(3)
二、溶液酶催化的反应动力学·····	(6)
(一) 酶反应的基本动力学关系·····	(6)
(二) 各种因素对酶反应动力学的影响·····	(17)
三、固定化酶催化的反应动力学·····	(30)
(一) 固定化对酶反应系统的影响·····	(30)
(二) 各种因素的动力学分析·····	(34)
参考文献·····	(69)

第二章 酶 反 应 器

一、酶的应用形式·····	(76)
二、酶反应器·····	(78)
(一) 酶反应器的形式·····	(78)
(二) 酶反应器的选择·····	(80)
(三) 酶反应器有关动力学问题·····	(83)
三、酶反应操作条件·····	(98)
四、固定化酶在酶分析中的应用·····	(100)
参考文献·····	(104)

第三章 酶及细胞的固定化方法

一、酶的固定化方法·····	(109)
(一) 吸附法·····	(110)
(二) 包埋法·····	(112)
(三) 共价键结合法·····	(117)

(四) 肽键结合法·····	(134)
(五) 交联法·····	(140)
(六) 各种固定化方法的比较·····	(143)
(七) 辅酶的固定化方法·····	(143)
二、固定化酶的形状与性质·····	(146)
(一) 固定化酶的形状·····	(145)
(二) 固定化酶的性质·····	(146)
三、细胞的固定化方法·····	(150)
(一) 吸附法·····	(151)
(二) 不用载体法·····	(152)
(三) 包埋法·····	(152)
(四) 絮凝法·····	(157)
四、固定化细胞的形状与性质·····	(158)
(一) 形状·····	(158)
(二) 性质·····	(158)
参考文献·····	(159)

第四章 固定化酶与固定化细胞的应用

一、工业方面的应用·····	(169)
(一) 生产L-氨基酸·····	(173)
(二) 生产果葡糖浆·····	(183)
(三) 生产6-氨基青霉烷酸·····	(205)
(四) 生产L-天门冬氨酸·····	(217)
(五) 生产L-苹果酸·····	(227)
(六) 生产葡萄糖·····	(233)
(七) 生产L-瓜氨酸·····	(248)
(八) 生产尿刊酸·····	(250)
(九) 生产甾体激素·····	(252)

(十) 生产3'-核苷酸	(257)
(十一) 生产5'-核苷酸	(260)
(十二) 生产 L-丙氨酸	(263)
(十三) 在食品和发酵工业方面的应用	(264)
二、医学方面的应用	(269)
(一) 治疗酶缺乏症	(270)
(二) 治疗癌症	(271)
(三) 治疗代谢异常症	(275)
(四) 制造人造器官	(276)
(五) 其他方面的应用	(278)
三、化学分析和临床诊断方面的应用	(279)
(一) 酶试剂	(280)
(二) 酶柱和酶管	(281)
(三) 酶电极	(285)
(四) 酶热敏电阻器	(292)
四、环境保护方面的应用	(293)
(一) 环境监测	(293)
(二) 处理三废	(294)
五、亲和层析	(299)
(一) 酶的提纯	(302)
(二) 抑制剂的提纯	(305)
(三) 抗体和抗原的提纯	(305)
(四) 结合蛋白和传递蛋白的提纯	(307)
(五) 激素的提纯	(308)
(六) 激素受体和药物受体的提纯	(308)
(七) 核酸研究中的应用	(308)
(八) 研究生物高分子结构和功能的工具	(309)

六、基础理论研究方面的应用.....	(310)
(一) 阐明酶反应的机制.....	(310)
(二) 细胞内酶模型的研究.....	(317)
(三) 研究蛋白质和核酸的分子结构的工具.....	(321)
(四) 其他方面的应用.....	(324)
七、开发新能源.....	(325)
(一) 直接产生氢气和甲烷.....	(326)
(二) 固定化生化电池.....	(327)
八、最近的进展.....	(330)
(一) 辅酶的保留、再生与循环使用.....	(331)
(二) 固定化多酶反应器.....	(334)
(三) 固定化微生物多酶反应系统.....	(338)
(四) 固定化酶-微生物复合物.....	(362)
(五) 固定化细胞器.....	(363)
九、展望.....	(365)
参考文献.....	(367)

第一章 固定化酶催化的反应动力学

酶是一种高效、高度专一的生物催化剂。在人类历史上,它的应用很早就已经开始,而且日益广泛,或者用于工农业加工生产、革新工艺,或者用于医药治疗,或者用于分析化验,同时它也是基础科学研究的一种重要对象和有力武器。但是,酶不是十全十美的,它有一个突出的弱点就是稳定性较低,对于高温、有机溶剂或极端的pH极其敏感,从而给酶的分离、制备、应用以及回收带来了一定的困难。酶的这一弱点随着六十年代后期固定化技术的发展得到了解决,固定化酶的出现,为酶的应用开辟了新的前景。现在,固定化酶的研究和应用已成为一个十分引人注目的领域^[1,2]。关于固定化酶的制备与应用将在本书的其他章节介绍,这一章我们集中讨论它的催化反应动力学。

化学反应动力学是研究化学反应速度规律的一门学科。由于化学反应都是在一定条件下进行的,因此反应速度除取决于反应的内在性质外,也受外界条件的影响。酶反应动力学和化学反应动力学一样,它是研究酶反应速度规律以及各种因素(包括固定化)对酶反应速度影响的科学^(3,4)。

酶反应动力学的研究对生产实践和基础理论都有十分重要的意义。例如,为了确定最有效的反应系统、反应条件和反应器,以期能以最少量的酶、最短的反应时间完成大量的反应;为了建立一个适宜的酶分析体系,以期能获得准确可靠的结果;为了筛选出理想的药物或毒物,以期能专一而

有力地达到治疗疾病和杀灭虫害的目的，这些都需要以酶反应动力学知识为依据。此外，酶反应动力学的研究也是探讨酶反应历程、酶的作用机制、阐明代谢过程、代谢调控的重要手段。对于固定化酶来说，研究它的催化反应动力学还有进一步的意义。这是因为，一方面固定化酶相对溶液酶具有许多突出的优点，例如能反复使用，易于和产物分离，有利于实现管道化、连续化和自动化等；另一方面，固定化酶的反应动力学性态又和溶液酶显著不同，酶在固定化以后，它的催化活性、酶反应动力学参数（如 k_m ），以及pH、温度、抑制剂和活化剂等对反应系统的影响往往都会发生一些变化，因此为了使固定化酶的上述潜力得以充分发挥，在着手选择适宜的固定化方法、设计合理的反应系统以及确定最佳的操作条件时，必须对固定化酶的反应动力学规律有一个较全面的了解^[6]；其次，随着分子生物学的发展，现在已经愈来愈清楚地认识到，在细胞中许多酶都是定位地结合在相应的细胞器或质膜上的，处于这种状态下的酶，它的催化性质也和处于溶液状态下的酶显然不同^[6]，为了阐明代谢规律，对于细胞中酶的这种“同素异态”特点，必须用一种不同于溶液酶的动力学体系和方法去进行研究，而固定化酶在很大程度上可用作这种研究的理论与实验模型^[7、8]；第三，在农业化学和土壤化学中常遇到与固定化酶类似的体系，因此固定化酶催化的反应动力学研究也直接关系到这一领域^[9]。

酶反应系统和一般化学反应系统相比要复杂得很多，因为在酶反应系统中除了反应物（在酶反应中称为底物）外，还有酶这样一种决定性的因素，以及影响酶和底物的其他因素。固定化酶反应和溶液酶反应相比，固定化酶反应又要更复杂一些。如果将影响酶反应动力学的因素归纳如表1-1，那

末目前经过系统研究的仅是其中一些最简单的系统，即如由表1-1内单酶系统列中各项所构成的体系，不过它们是研究复杂的酶反应体系的基础，固定化酶催化的反应动力的研究也可以从这个基础出发逐渐深化。为了有助于固定化酶催化的反应动力学的讨论，下面先回顾一下均相溶液系统中的化学反应动力学规律和溶液酶催化的反应动力学规律。

表 1-1 影响酶反应动力学的因素

酶系统:	单酶系统	多酶系统
酶性质:	"恒态酶"	别构酶
酶状态:	溶液酶	固定化酶
底物参加数目:	单底物	双或多底物
动力学类型:	稳态动力学	稳态前动力学
稳 态:	初过程	全过程
其他影响因素: 温度、pH、抑制剂、活化剂以及其他效应物等。		

一、均相系统的某些化学反应动力学关系^[10]

在这一节里简要地列述一些与酶反应动力学有关的均相系统的化学反应动力学关系式与概念:

先从最简单的反应系统开始: $A \xrightarrow{k_1} B$

如果是零级反应: $-dA/dt = k_1^*$

$$A = A_0 - k_1 t \quad (t < A_0/k_1) \text{ 或} \quad (1.1)$$

• 为简便起见，反应物（或底物）和产物的浓度直接以它们符号（如A、B...等）表示； k 表示反应速度常数； t 表示反应时间； k 表示平衡常数或解离常数。不同。

$$A=0(t \geq A_0/k_1) \quad (1.2)$$

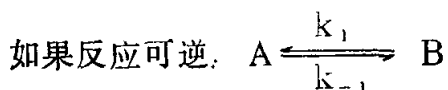
这种情况下，反应速度与反应物浓度无关；A与t之间有线性函数关系； k_1 的单位为浓度/时间。

$$\text{如果是一级反应：} -dA/dt = k_1 \cdot A \quad (1.3)$$

$$A = A_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad (1.4)$$

$$t = (\ln A_0/A)/k_1 (= 2.3 \log(A_0/A)/k_1) \quad (1.5)$$

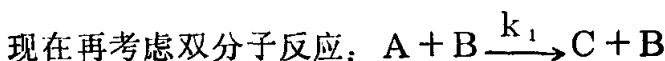
这种情况下，反应速度与反应物浓度成比例；A与t之间为半对数函数关系； k_1 的单位为1/时间。



$$\text{反应按一级反应进行，此时：} -dA/dt = k_1 \cdot A - k_{-1} \cdot B \quad (1.6)$$

$$K_{eq} = k_1/k_{-1} (= B/A) \quad (1.7)$$

这种情况下，平衡常数 K_{eq} 为无因次常数。

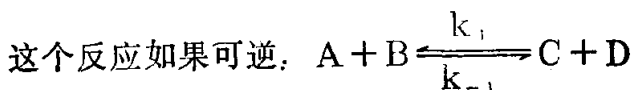


$$\text{此时：} -dA/dt = k_1 \cdot A \cdot B \quad (1.8)$$

如果反应系统中， $A \gg B$ ，则 $A \approx A_0$ ，这样：

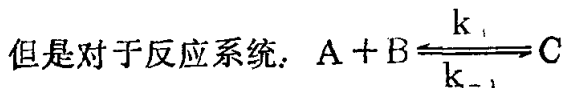
$$-dA/dt (= k_1 \cdot A_0 \cdot B) = k'_1 \cdot B \quad (1.9)$$

此时可看作拟一级反应，如水解反应。



$$K_{eq} = C \cdot D / A \cdot B \quad (1.10)$$

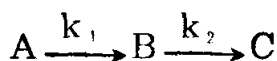
这种情况下， K_{eq} 同样为无因次常数。



$$-dA/dt = k_1 \cdot A \cdot B - k_{-1} \cdot C \quad (1.11)$$

$$K_{eq} = C/A \cdot B \quad (1.12)$$

此时, K_{eq} 的因次为 $1/\text{浓度}$; 其解离常数为浓度因次。
最后再讨论一下连续反应系统,



如果第一个是零级反应, 第二个是 1 级反应, 则,

$$-dA/dt = k_1 \quad A = A_0 - k_1 t \quad (1.13)$$

$$dB/dt = k_1 - k_2 B \quad B = k_1/k_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad (1.14)$$

$$dC/dt = k_2 \cdot B \quad C = k_1 \cdot t - k_1/k_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad (1.15)$$

现在如果加入大量能加速第二个反应的催化剂, 使 k_2 无限增大, 那末中间产物 B 就不会积累, 终产物 C 的浓度趋于 C_∞ 而接近于 A 的变化, 这里引入接近度 (η),

$$\eta = C/C_\infty \quad (C_\infty = k_1 t, \text{ 见 } 1.15)$$

$$= 1 - [(1 - e^{-k_2 t})/k_2 t] \quad (1.16)$$

η 为终产物 C 与原始反应物 A 变化的接近度。 η 愈接近 1 时, 终产物的生成愈能反映原始反应物的减少。

如果第一个和第二个反应都是一级反应, 那末,

$$-dA/dt = k_1 A \quad A = A_0 e^{-k_1 t} \quad (1.17)$$

$$dB/dt = k_1 A - k_2 B$$

$$B = A_0 k_1 / (k_1 - k_2) \cdot (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}) \quad (1.18)$$

$$dC/dt = k_2 \cdot B$$

$$C = A_0 + A_0 (k_2 / (k_1 - k_2)) \cdot e^{-k_1 t} - k_1 / (k_1 - k_2) \cdot e^{-k_2 t} \quad (1.19)$$

$$\text{此时, } \eta = [1 + e^{-\alpha k_1 t} / (\alpha - 1) - \alpha / (\alpha - 1) e^{-k_1 t}] / (1 - e^{-k_1 t}) \quad (1.20)$$

其中: $\alpha = k_2/k_1$

二、溶液酶催化的反应动力学

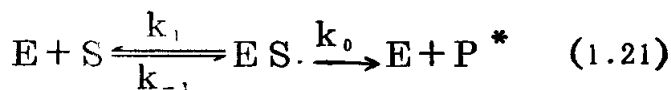
要讨论固定化酶催化的反应动力学就必须先对溶液酶反应动力学有一定的了解，而溶液酶反应动力学的讨论又必须从酶反应的基本动力学关系开始。

(一) 酶反应的基本动力学关系^[8, 4]

所谓酶反应基本动力学关系，乃是指酶反应速度和酶与底物之间的动力学关系。对任何一个酶反应系统来说，由于酶和底物是最基本构成的因素，它们一方面决定酶反应的基本性质，另一方面，各种因素又必须通过它们才能产生影响，因此这种动力学关系是整个酶反应动力学的基础。而正确地描写这种基本动力学关系的是米氏方程(即Michealis-Menten方程)。

1. 酶反应基本动力学方程(米氏方程)的推导

为了建立反应动力学关系，一般先要了解反应方式与反应历程。对于酶反应来说，有多种描写其作用机制的学说，其中得到较多实验支持的是活性中间络合物学说，即认为酶反应的进行先要通过酶(E)与底物(S)结合形成酶-底物络合物(ES)，然后酶催化底物转化为产物(P)，同时酶也被释放出来再参加下一轮反应，最简单的情况可表示成：



根据这种机制，酶反应速度 v 由下式决定：

$$v = k_0 \cdot ES^* \quad (1.22)$$

式 (1.22) 是所有酶反应动力学方程推导过程中具有关键性的关系式。现在的问题是要解出ES。ES有几种方法可以解得, 较早采用的是代数法⁽¹¹⁻¹³⁾, 适于简单的反应; 对于复杂的反应则多用矩阵法和图象法, 尤以图象法常用⁽¹⁴⁾。用这三种方法推导酶反应动力学方程时, 通常都要作一个共同假定, 即底物浓度远大于酶浓度($S \gg E$), 因为在这种情况下, 酶和底物一混合, ES 就会在极短时间内迅速达到动态平衡, 反应系统进入稳态, 可以使问题大大简化。在这一前提下, 于是可以求得,

$$dES/dt=0, \quad k_1(S-ES)(E-ES)-k_{-1} \cdot ES-k_0ES=0,$$

$$k_1 \cdot S(E-ES)-k_{-1}ES-k_0ES=0$$

(因 $S \gg E$, 故 $S-ES \div S$)

$$ES=E_0S/((k_{-1}+k_0)/k_1+S) \quad (1.23)$$

代入式 (1.22), 就可得到酶反应基本动力学方程,

$$v=k_0ES/((k_{-1}+k_0)/k_1+S) \quad (1.24)$$

$$\text{或 } v=VS/(K_m+S) \quad (1.25)$$

$$\text{其中 } V=k_0E \quad (1.26)$$

$$K_m=(k_{-1}+k_0)/k_1 \quad (1.27)$$

2. 米氏方程的意义

式1.24 (或式1.25) 又称为米氏方程, 它是酶反应的最基本的动力学关系式, 有如下具体意义:

(1) 提供了两个极为重要的酶反应动力学常数, 即 K_m 以及 k_0 , 并通过它们表达了反应性质、反应条件与反应速度之间的关系。

• E 代表酶。 E_0 、E 和 ES 分别代表总的、游离的和形成络合物的酶浓度; S 和 P 分别代表底物和产物及其浓度。下同。