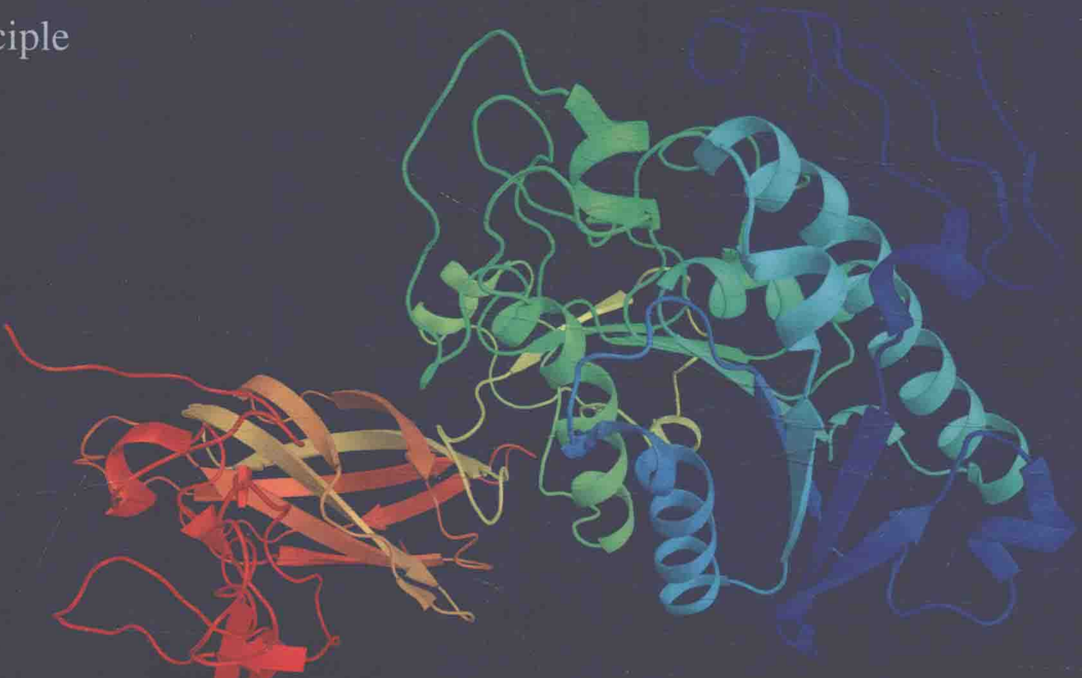
食品酶学与酶工程原理

Food Enzymology and Enzyme Engineering Principle

江正强　杨绍青　编著



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

食品酶学与酶工程原理

江正强　杨绍青　编著

中国轻工业出版社

图书在版编目（CIP）数据

食品酶学与酶工程原理 / 江正强，杨绍青编著．—北京：中国轻工业出版社，2018.9
国家科学技术学术著作出版基金资助出版
ISBN 978-7-5184-1952-4

Ⅰ.①食… Ⅱ.①江… ②杨… Ⅲ.①食品工艺学—酶学 ②酶工程 Ⅳ.①TS201.2②Q814

中国版本图书馆CIP数据核字（2018）第089831号

责任编辑：伊双双　　责任终审：张乃柬　　整体设计：锋尚设计
责任校对：吴大鹏　　责任监印：张　可

出版发行：中国轻工业出版社（北京东长安街6号，邮编：100740）
印　　刷：三河市万龙印装有限公司
经　　销：各地新华书店
版　　次：2018年9月第1版第1次印刷
开　　本：787×1092　1/16　印张：21.75
字　　数：500千字
书　　号：ISBN 978-7-5184-1952-4　定价：80.00元
邮购电话：010-65241695
发行电话：010-85119835　　传真：85113293
网　　址：http://www.chlip.com.cn
Email：club@chlip.com.cn
如发现图书残缺请与我社邮购联系调换
160925K1X101ZBW

前言

生物技术是21世纪最具发展潜力的技术之一，酶工程是生物技术领域的前卫产业和大有希望的新兴战略性产业。酶制剂作为一类高效的生物催化剂，具有催化效率高、专一性强、可控性高和安全环保等优点，目前已广泛应用于不同行业，尤其是在食品、饲料、环境保护、造纸、医药、化工以及农业等领域，在提升相关产业技术水平、促进新产品开发、提高产品质量、节能降耗以及保护环境等方面发挥了重要作用，产生了巨大的社会、经济和生态效益。随着酶工程技术的不断进步与酶制剂应用领域的不断拓展和深入，酶制剂将成为推动国民经济快速发展的催化剂。

食品工业是应用酶制剂最多的行业，酶制剂的使用量大、市场广阔，且其应用范围越来越广。随着我国酶学基础研究的不断深入和酶制剂工业的快速发展，国内酶制剂品种逐渐增多，技术水平不断提高，与发达国家之间的差距正逐步缩小。但是由于我国工业酶制剂行业起步较晚，还面临着一些不足，如工业酶制剂种类仍相对偏少、结构不合理、相关生产企业规模偏小、同质化现象严重以及缺少技术储备等，难以满足日益扩大的应用市场需求，致使70%以上的市场份额被国际酶制剂公司垄断，较高的酶制剂垄断价格束缚了我国食品行业的技术进步。

在国家自然科学基金、国家“863”计划等的资助下，我于2002年在中国农业大学食品科学与营养工程学院组建了食品酶与发酵工程实验室。在过去的十余年里，研究团队围绕食品工业用新型酶的发掘、酶基因的克隆与高效表达、酶的纯化与性质、酶的作用机制、酶的结构解析、酶的应用以及产业化开展了较为系统的研究，并取得了一些成果。编写本书也是对团队多年来所完成的食品酶学相关理论和应用研究工作的一次梳理和总结。考虑到全书的系统性和全面性，本书还引用了国内外同行的最新研究成果和研究进展。

本书编写分工：江正强编写了第一、三、四、五、七和九章（第七节）内容；杨绍青编写了第二、六、八和九章（第一至六节）内容；杨栋参与编写了第七章内容。

近年来在酶学及酶工程领域所取得的一些成绩离不开前辈和同行的关心、支持、鼓励，同时也期望与同行一起为推动我国食品酶制剂和食品行业的快速、健康发展而共同努力。

由于作者水平有限，书中尚有很多不足之处，恳请各位同行批评指正。

江正强

2018年9月于北京　中国农业大学

目 录

第一章
绪论

第一节 酶学及酶工程发展简史……2
一、酶学与酶工程……2
二、酶学发展简史……2
三、酶工程发展简史……5

第二节 酶学与酶工程基础……6
一、酶与酶催化……6
二、酶催化的特点……6
三、酶的结构和功能……7
四、酶的应用基础……8

第三节 酶的生产历史……9

第二章
酶的分类、命名及生物信息学

第一节 酶的习惯命名法与系统命名法……12
一、习惯命名法……12
二、系统命名法……12

第二节 酶的其他分类命名法……14
一、单体酶和寡聚酶……14
二、恒态酶和调节酶……15
三、组成酶和诱导酶……15

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

四、多酶复合体（多酶系统）…… 15
五、胞内酶和胞外酶…… 17
六、酶的多形性和同工酶…… 18
七、辅酶和辅助因子…… 18

第三节　酶资源相关数据库…… 19
一、NCBI 数据库…… 19
二、BRENDA 酶数据库…… 19
三、EC-PDB 数据库…… 20
四、CAZy 糖苷水解酶数据库…… 21
五、ExPASy 酶数据库…… 25
六、KEGG ENZYME 数据库…… 26

第三章
食品酶资源的发掘

第一节　食品酶的主要来源…… 30
一、传统方法筛选酶…… 30
二、基于宏基因组学的方法发掘新酶…… 31
三、从极端环境中发掘新酶…… 34
四、从基因和蛋白数据库中发掘新酶…… 35

第二节　基因工程菌的构建…… 36
一、原核表达…… 36
二、真核表达…… 43

第四章
酶的发酵生产

第一节　酶发酵生产的方式…… 54
一、天然动植物酶的生产…… 54
二、微生物酶的生产…… 56

第二节　影响发酵产酶的主要因素…… 64
一、固体发酵的培养条件…… 64

二、液体发酵的培养条件…………………………………………………………………… 66

第三节　发酵过程的优化与控制………………………………………………… 68
一、酶的生产工艺流程……………………………………………………………………… 68
二、酶的发酵染菌及其控制………………………………………………………………… 69
三、食品级酶发酵生产举例………………………………………………………………… 70

第四节　酶发酵产量的提高……………………………………………………… 71
一、酶的合成调控机制……………………………………………………………………… 71
二、通过条件控制提高酶产量……………………………………………………………… 74
三、通过基因突变提高酶产量……………………………………………………………… 76
四、通过体内基因重组提高酶产量………………………………………………………… 79
五、通过体外基因重组提高酶产量………………………………………………………… 81
六、其他提高酶产量的方法………………………………………………………………… 85

第五章

酶的分离和纯化

第一节　酶的分离纯化策略……………………………………………………… 88
一、基本原则………………………………………………………………………………… 88
二、纯化方法的选择………………………………………………………………………… 89
三、纯化策略………………………………………………………………………………… 90
四、纯度的检定……………………………………………………………………………… 93

第二节　酶液的制备和初分离…………………………………………………… 95
一、发酵液的固液分离……………………………………………………………………… 95
二、细胞破碎………………………………………………………………………………… 95
三、抽提……………………………………………………………………………………… 97
四、脱盐……………………………………………………………………………………… 98
五、浓缩……………………………………………………………………………………… 99
六、初分离…………………………………………………………………………………… 100

第三节　酶的分离纯化方法……………………………………………………… 101
一、利用溶解度差异建立的纯化方法……………………………………………………… 101
二、利用分子大小差异建立的纯化方法…………………………………………………… 107
三、超滤……………………………………………………………………………………… 111

四、利用电学解离性质差异建立的纯化方法……114
五、利用亲和作用进行纯化的方法……122
六、利用稳定性差异建立的纯化方法……127

第六章
酶的基本性质及动力学

第一节　酶活力的测定与表征……130
一、酶活力及其表征……130
二、酶活力的测定原理……132
三、酶活力的测定方法……134

第二节　酶的基本性质……136
一、温度对酶作用的影响……136
二、pH 对酶作用的影响……138
三、酶浓度对酶作用的影响……139
四、激活剂对酶作用的影响……139

第三节　酶催化反应的动力学……140
一、酶催化反应的动力学类别及特征……141
二、酶催化反应的动力学调节……146
三、产物抑制……150
四、底物抑制……150

第七章
酶的结构与蛋白质工程

第一节　酶的结构……154
一、酶的一级结构……155
二、酶的二级结构……158
三、酶的超二级结构……160
四、酶的三级结构……161
五、酶的四级结构……165
六、多亚基酶的别构调控……167
七、杂合酶……168

第二节　酶的修饰和改造…… 171
一、酶的化学修饰…… 172
二、酶的物理修饰…… 177
三、酶的蛋白质改造…… 178

第三节　酶的定向进化…… 179
一、易错 PCR …… 180
二、DNA 改组和外显子改组 …… 182
三、定向进化的其他方法…… 188

第四节　酶的理性设计…… 188
一、基于定点突变的酶分子理性设计…… 189
二、模块重组法…… 193
三、设计全新蛋白质…… 194

第八章

固定化酶、细胞及全细胞酶

第一节　酶的固定化技术…… 200
一、吸附法…… 201
二、共价结合法…… 202
三、包埋法…… 203
四、交联法…… 204
五、定向固定法…… 204

第二节　固定化酶的性质与表征…… 205
第三节　固定化载体及影响酶吸附的因素…… 207
一、固定化载体的选择…… 207
二、影响酶吸附的因素…… 209

第四节　全细胞酶…… 211
一、天然全细胞酶…… 212
二、人工全细胞酶…… 213
三、全细胞酶的性质与表征…… 215

第五节　固定化酶（细胞）的评价指标…… 215
一、固定化酶（细胞）的活力…… 215

二、蛋白质含量的测定…………216
三、固定化率及酶活力回收率的测定…………216
四、固定化酶（细胞）的半衰期…………217

第九章 食品酶的应用

第一节　酶制剂应用概况…………220
一、酶的应用发展历史…………220
二、酶制剂的应用现状…………221

第二节　制糖工业用酶及其应用…………222
一、葡萄糖的制备…………223
二、果葡糖浆的制备…………224
三、麦芽糖和异麦芽糖的制备…………224
四、环糊精的制备…………225

第三节　果蔬加工用酶及其应用…………226
一、果汁脱苦…………226
二、果蔬罐头加工、防浊与护色…………227
三、果汁、果酒加工…………227
四、果蔬制品的贮藏与保鲜…………228

第四节　乳制品和肉制品工业用酶及其应用…………229
一、乳制品工业用酶及其应用…………229
二、肉制品工业用酶及其应用…………230

第五节　粮油食品加工用酶及其应用…………233
一、粮食制品加工与品质改良…………233
二、油脂的压榨与改性…………234

第六节　食品工业其他领域用酶及其应用…………235
一、生物活性成分的制备…………236
二、香精、香料的生产…………239
三、甜味剂的合成…………240
四、酒类酿造…………240
五、氨基酸生产…………242

第七节　酶应用的发展趋势与展望…………………………………… 242
一、酶应用的发展趋势……………………………………………………242
二、酶应用的展望……………………………………………………………244

附录

附录一　GB/T 20370—2006《生物催化剂　酶制剂分类导则》 ……………… 246
附录二　食品用酶制剂及其来源名单（GB 2760—2014
《食品安全国家标准　食品添加剂使用标准》节选）…………………… 252
附录三　GB 1886.174—2016《食品安全国家标准　食品添加剂
食品工业用酶制剂》……………………………………………………… 259
附录四　GB 4789.43—2016《食品安全国家标准　食品微生物学检验
微生物源酶制剂抗菌活性的测定》…………………………………… 292
附录五　GB/T 24401—2009《α-淀粉酶制剂》 ………………………………… 298
附录六　GB/T 23527—2009《蛋白酶制剂》 ………………………………… 316

参考文献…………………………………………………………………………… 330

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

第一章

绪论

第一节 酶学及酶工程发展简史
第二节 酶学与酶工程基础
第三节 酶的生产历史

第一节
酶学及酶工程发展简史

一、酶学与酶工程

酶（enzyme）是由活细胞产生的具有催化功能活性的特殊蛋白质，在生物体内各种生理活动中发挥着重要的作用。酶的来源非常广泛，动物、植物和微生物在生长和代谢过程中均会合成种类繁多的酶。**酶学**（enzymology）是研究酶的理化特性、催化作用规律、结构与作用机制、生物学功能以及实际应用特性的一门学科。将酶引入工业的技术称作酶工程，即将酶、细胞或细胞器等置于特定的生物反应器中，利用酶所具有的生物催化功能，借助工程手段将相应的原料转化成有用物质并应用于社会生活的一门科学。“酶工程”这一术语出现在 20 世纪 70 年代初，1971 年在美国召开的第一次国际酶工程会议上，酶工程被定名为“enzyme engineering”，标志着酶工程学科和完善的技术体系的形成。

随着基因工程（DNA 重组）技术的发展，酶工程也涵盖利用传统突变技术或分子生物学技术突变酶蛋白质上的氨基酸，以改变酶蛋白质的化学性质和性能。酶工程是酶学、微生物学、重组技术与化学工程等有机结合而产生的交叉学科，多学科渗透和融合是现代酶工程的基本特征。

二、酶学发展简史

酶学及酶工程的发展是基于人类在生产和生活实践中对酶的认识和应用而逐步发展起来的。早在几千年前，我们的祖先就曾有酿酒、制醋、制酱和制作干酪的历史资料记载，而且懂得用“麴”来治疗消化不良等不适症状，说明古人已经对酶有了初步的了解，所有这些实际上都是对酶的无意识应用。然而对酶的本质及重要性的认识则主要发生在近代。人们对酶的发现和其本质的认识经历了一个不断发展、逐步深入的过程。

1833 年，法国化学家安塞姆·佩恩（Anselme Payen）和让 - 弗朗索瓦·帕索兹（Jean-Francois Persoz）从麦芽的水抽提物中分离得到一种活性物质，发现该物质能够促进淀粉分解成糖。他们把这种物质称为**淀粉糖化酶**（diastase，意思是“分离”），并且在研究中还发现所获得的无细胞物质的催化特性具有热不稳定性，初步涉及酶的一些本质性问题。因此，人们认为是佩恩和帕索兹在人类历史上首先发

现了酶。此后，1861 年法国生物学家巴斯德（Pasteur）研究利用酵母菌进行酒精发酵时，发现发酵容器存在氧气会导致酒精产生停止，认识到在活的酵母细胞内存在一种能够将糖发酵生成酒精的物质。直到 1878 年，德国生理学家威廉·屈内（William Kühne）才首次将酵母中参与酒精发酵的物质称为“enzyme”，他提出 enzyme 这一名词，用以表示已知的各种有机体抽提物（Organized ferments）。enzyme 是希腊文，原意是指“在酵母中”，其中“en”表示在……之内（in），“zyme”表示酵母（yeast）。日本最初将 enzyme 译成“酵素”，国内学者将 enzyme 翻译成“酶”。

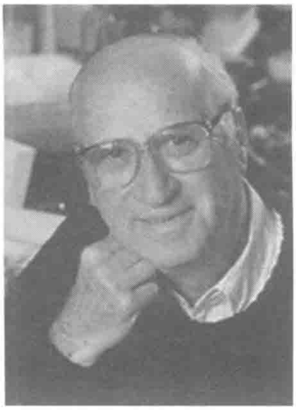
1896 年，德国化学家爱德华·毕希纳（Eduart Büchner）用石英砂磨碎酵母细胞，制备了不含酵母细胞的抽提液。此提取液或无细胞滤液也能将葡萄糖发酵成乙醇，表明酶不仅在细胞内，而且在细胞外也可进行催化作用，从而证明了发酵是酶作用的化学本质。他把这种能发酵的蛋白质称为**酒化酶（eymase）**。此项发现促进了酶的分离和对其理化性质的探讨，也推进了对各种生物过程中酶系统的研究，标志着发酵及酶学研究领域的新突破，开启了酶学研究的篇章。爱德华·毕希纳也因发现无细胞发酵及相应的生化研究而获得了 1907 年度的诺贝尔化学奖。

随后，酶的科学研究活动越来越频繁，研究越发深入，酶的蛋白质天然属性得以揭示，几个著名学说的提出成为酶催化理论研究的基础。大约从 1894 年开始，德国有机化学家埃米尔·费歇尔（Emil Fisher）开始潜心研究酶催化的基础内容，提出了著名的酶与底物作用的“锁钥学说”，可以用来解释酶作用的立体专一性。英国化学家阿德里安·布朗（Adrian Brown）和法国生物化学家维克托·亨利（Victor Henri）分别于 1902 年和 1903 年提出了酶的中间产物学说，认为酶的高效催化效率是由于酶首先与底物结合，生成不稳定的中间产物（又称中心复合物，central complex），然后中间产物再分解为反应产物，最后释放出酶。1913 年，德国生物化学家利奥诺·米歇里斯（Leonor Michaelis）和莫德·曼吞（Maud Menten）（图 1-1）根据中间产物学说提出了“快速平衡学说”，推导出酶促反应动力学的基本动力学方程——米氏方程，这对酶反应机制的研究是一个重要突破。

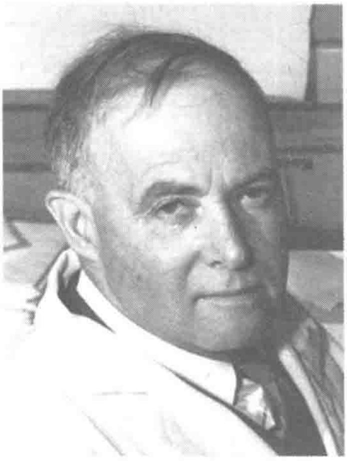
20 世纪初期，酶的生化特性仍是未知的，许多科学家观察到酶活性与蛋白质之间的关联性，但仍然缺少最直接的证据。1926 年，美国生化学家詹姆斯·B. 萨姆纳（James B. Sumner）首次从刀豆种子中获得了脲酶的结晶（图 1-2），并通过化学实验首次证实脲酶是一种蛋白质。美国生化学家诺思罗普（Northrop）和库尼茨（Kunitz）在 1930—1936 年得到了更多的酶结晶（如胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶），并用化学的方法证实了酶是一种蛋白质，之后酶是蛋白质的本质才普遍被人们所接受。为此萨姆纳和诺思罗普于 1949 年共同获得了诺贝尔化学奖。

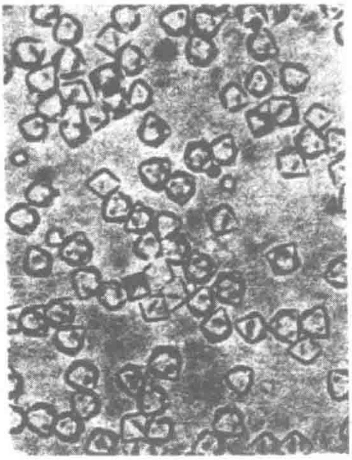
利奥诺•米歇里斯
（Leonor Michaelis，1875—1949）

莫德•曼吞
（Maud Menten，1879—1960）


丹尼尔•E.科什兰
（Daniel E. Koshland，1920—2007）

◂ 图1-1 部分酶学研究奠基人


詹姆斯•B.萨姆纳
（James B. Sumner，1887—1995）


脲酶晶体图

◂ 图1-2 詹姆斯·B.萨姆纳及其获得的脲酶晶体

在酶的催化作用规律和机制方面，人们认识得相对较慢。1958 年，美国化学家丹尼尔 · E. 科什兰（Daniel E. Koshland）（图 1-1）认识到酶在催化过程中其结构具有柔性，在此基础上提出了“诱导契合学说”，以解释酶的催化理论和专一性。之后法国生物化学家莫诺（Monod）于 1961 年提出了“变构模型”用以定量解释酶的活性可以通过结合小分子进行调节，从而提供了认识细胞中许多酶调控作用的基础。

1982 年，美国生物学家切赫（Cech）和化学家奥尔特曼（Altman）分别发现了具有催化功能的 RNA——**核酶（ribozyme）**。切赫发现四膜虫细胞中的一种 rRNA 前体具有自我剪接的功能，奥尔特曼发现核糖核酸酶 P 的 RNA 部分具有核糖核酸酶 P 的催化活性，打破了酶是蛋白质的传统观念，为此切赫和奥尔特曼于 1989 年共同获得诺贝尔化学奖。

三、酶工程发展简史

在酶学研究蓬勃发展的同时，酶的生产和应用也越来越广泛，酶工程技术逐步发展。20 世纪 50 年代以前是酶工程技术形成的初级阶段，主要是从动物、植物和微生物原料中经提取、分离、纯化来制造各种酶，并加以利用。1894 年，日本科学家高峰让吉首先从米曲霉中制得淀粉酶用作消化剂，开创了有目的地进行酶生产和应用的先例。1949 年，日本开始采用微生物液体深层发酵方法进行细菌 α－淀粉酶的生产，揭开了近代酶工业的序幕。酶制剂的生产和应用进入到工业化阶段。20 世纪 60 年代，固定化酶技术的工业应用是酶工程发展的重要转折点。1969 年，日本科学家千畑一郎首次在工业上应用固定化氨基酰化酶转化 DL－氨基酸生产 L－氨基酸，出现了“酶工程”这个名词来代表有效利用酶的科学技术领域。1971 年，第一届国际酶工程学术会议在美国召开，当时的主题即是固定化酶，酶工程学科和技术体系正式形成。20 世纪 70 年代后期，酶的固定化技术取得了突破，固定化酶、固定化细胞、生物反应器与生物传感器等酶工程技术迅速发展并得到应用。

随着基因工程的发展，酶工程的研究被赋予了新的内涵。20 世纪 80 年代实现了酶基因的克隆，此后以基因工程为先导的生物酶工程逐步形成。基因工程技术的应用，不仅极大地推进了更优质、更经济的酶（生物催化剂）的生产，还拓宽了酶的应用规模，酶的稳定性也得以增强，酶的应用成本显著降低。与之相关的定点突变、随机突变、基因重组、定向进化等技术的发展，也开启了对酶的催化性质进行改造和修饰的先河。近 20 年来，以定向进化、酶蛋白的理性设计为代表的分子酶学的飞速发展，可简便而高效地实现酶的催化活力、稳定性、专一性以及环境适应性等多方面的改造，不仅为酶的大规模应用创造了条件，同时使研究者能够更快、更多地了解蛋白质结构与功能之间的关系，揭示酶在生命活动中的作用机制。另外，抗体酶、人工酶、模拟酶等新的研究进展不断涌现，以及酶的化学修饰等酶的应用技术的快速发展，使酶工程在研究和工业应用方面不断向广度和深度发展，显示出广阔而诱人的前景。目前，酶工程的应用已经覆盖到所有人类需要的产品生产（如食品、饲料、药品、精细化学品、材料、医疗保健、能源、环境等）和分析诊断领域。

第二节

酶学与酶工程基础

一、酶与酶催化

新陈代谢是生命活动的基础，而构成新陈代谢的许多复杂而有规律的物质变化和能量变化，都是在酶催化下进行的。酶参与了生物体内所有的生命活动和生命过程，可以说没有酶生命就不能进行下去。酶是生物体内进行新陈代谢不可缺少并受多种因素调节控制的具有催化能力的生物催化剂，是由活细胞产生的具有生物催化功能的生物大分子（蛋白质或 RNA/DNA）。

由酶催化的反应称为**酶促反应**，酶所作用的物质称为**底物**，经反应生成的物质称为**产物**。酶所具有的催化能力的高低可用**酶的活力**（enzyme activity）或**酶的转换数**（turnover number）来描述。酶的活力以一定条件下酶所催化的反应初速度表示，即单位时间内反应物的量（底物减少量或产物生成量）。在外界条件相同的情况下，反应初速度越大，酶的活力越高。酶的转换数是指一个酶分子在底物浓度饱和时，单位时间内能转换的底物分子数，即单位时间内有多少底物分子转变为产物。此外，**酶反应的动力学常数**也是表征酶性质的重要参数。**米氏方程**就是酶动力学定量理论的扩展。通过米氏方程计算，可测定酶的动力学常数（又称米氏常数）K_m。K_m 是酶的特征常数，当 pH、温度和离子强度恒定时，K_m 只与酶和底物的性质有关，与酶的浓度无关。K_m 可表示酶与底物之间的亲和力；K_m 越小，表示酶对底物的亲和力越大。不同的酶具有不同的 K_m，同一种酶对不同的底物具有不同的 K_m。影响酶反应速度的因素很复杂，**酶动力学**就是研究各种反应条件对酶结合底物能力和酶催化反应速率影响关系的科学，为揭示生命的节奏以及阐明酶催化反应的速度关系和酶调控的基本机制提供了强有力的理论支持，是酶学研究的重要内容。

二、酶催化的特点

酶的作用机制是降低反应的活化能以提高化学反应的速率。酶是生物催化剂，具有一般催化剂的共同点，即①只改变化学反应速率，反应前后本身的质与量不变；②只能催化热力学上允许进行的反应；③降低反应的活化能，加快化学反应速率，缩

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com