



上册

张树政 主编

酶制剂工业

科学出版社

酶 制 剂 工 业

上 册

张树政 主编

编 委

伦世仪 朱庆裴 杨子培

徐家立 胡学智

(按姓氏笔划排列)

科 学 出 版 社

1 9 8 4

内 容 简 介

本书分上下两册出版。上册介绍酶制剂生产基本原理和生产设备、试验室的精制方法以及酶的固定化技术等;下册分别介绍蛋白酶、淀粉酶、葡萄糖异构酶等二十多种酶制剂的性质、测定方法、菌种来源、生产方法和应用等。全书共分二十五章,并附有主要参考文献。

本书可供从事酶的研究、生产和应用的技术人员以及有关专业的大专院校师生参考。

酶 制 剂 工 业

上 册

张树政 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1984 年 7 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1984 年 7 月第一次印刷 印张: 24 1/2

印数: 0001—4,400 字数: 572,000

统一书号: 13031·2607

本社书号: 3589·13-10

定价: 3.80 元

序

酶制剂工业是发酵工业中的一个新兴部门。它们的应用范围很广,现在已从传统的食品和发酵工业扩展到日用化工、纺织、制革、医药、水产加工、木材加工、造纸和农业等各个部门。酶制剂工业本身产值虽不算高,但采用酶法工艺的行业,对于简化工艺条件,增加产品品种,提高产品质量,降低能源及原材料消耗,节省设备投资,减轻劳动强度,提高劳动生产率,开展综合利用,减少三废污染等发挥很大的作用。近年来,在酶应用技术方面,取得了很大的进展,酶的工业应用正处于交叉的更迭时期,继作为第一代酶的酶制剂得到广泛应用以后,又出现了第二代酶——固定化酶技术,而正在发展的第三代酶——包括辅助因子在内的固定化多酶反应体系,亦即将登上工业应用的舞台。可以预期,随着生物工程学中的重要分支——酶工程学的进展,酶制剂工业将会得到进一步发展,在开拓新的食品来源和能量来源、治理三废、治疗各种疾病,乃至引起发酵和化学合成工业的变革等方面将会发挥更大的作用。

当我们展望我国酶制剂工业未来时,既要珍视我国在酶的应用方面古老的传统,悠久的历史以及在党的领导下我国酶制剂工业的发展取得的成就,也要看到我们的差距。我国具有一套独特的制曲技术,可以说,其中的大曲、红曲就是粗酶制剂的典型代表,也是近代微生物酶制剂的雏型,这些都值得我们继承和发扬。现今我国酶制剂工业已具有一定规模,但和世界先进水平相比,无论在产量、质量、花色品种,或是在工艺水平以及生产设备等方面尚存在一定的差距。正当国家大力发展生物工程学之际,我们编写的这部《酶制剂工业》和读者见面,以期满足从事酶的研究、生产和应用的技术人员的需要,为推动我国酶制剂科研和生产的发展,促进酶制剂工业现代化贡献出一份力量。

全书分上下两册,上册主要介绍酶制剂生产基本原理和生产设备、试验室精制方法及固定化酶技术等;下册分述淀粉酶、蛋白酶、葡萄糖异构酶等 20 多个酶制剂品种,每章(或节)均附有主要参考文献。由于此书在酶制剂领域内涉及的范围较广,因而参加编写人员较多,编写时间也较长些。此书始于 1976 年 12 月编写提纲,于 1978 年下半年以后陆续定稿。既然编写人员较多,不可避免文风各异,对于书中涉及的专业术语只能尽力作到统一,内容力求连贯。

在此书的编写过程中,先后于 1976 年 12 月在无锡召开了编写提纲座谈会,于 1978 年 6 月在天津召开了定稿会,于 1979 年 3 月在北京召开了审定会。在这些会上得到轻工业部食品局、无锡酶制剂厂、天津市食品发酵工业公司、天津工业微生物研究所等部门和单位以及有关同志的大力支持,在此一并致谢!

由于我们水平所限,错漏之处在所难免,尚祈读者不吝赐教。

酶制剂工业编委会

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 酶制剂工业的发展概况	1
1.2 酶制剂工业在国民经济中的重要性	5
1.3 我国的酶制剂工业	7
1.4 酶制剂工业的发展方向	9
第 2 章 酶学基本原理	12
2.1 分类和命名	12
2.2 结构与功能	15
2.3 酶动力学	28
2.4 影响酶活性的各种因素	36
2.5 酶活性的测定	44
第 3 章 菌种的分离筛选与遗传育种	50
3.1 菌种的分离筛选	50
3.2 微生物的遗传与变异	54
3.3 微生物遗传物质传递的若干形式	64
3.4 突变和突变的分子机理	68
3.5 突变体的种类和分离	76
3.6 蛋白质合成的遗传调节	81
3.7 酶制剂高产菌株的选育	85
3.8 遗传工程	91
3.9 菌种保藏问题	96
第 4 章 酶的发酵技术	101
4.1 原料和辅助原料	101
4.2 发酵方法	104
4.3 培养基的制备	106
4.4 种子培养	112
4.5 发酵条件对产酶的影响	115
4.6 防止染菌和检查杂菌方法	118
第 5 章 空气除菌及发酵的设备	123
5.1 空气除菌设备	123
5.2 发酵罐	152
第 6 章 酶制剂的工业提取法	189
6.1 微生物发酵液的预处理及过滤	190
6.2 盐析法	196

6.3	有机溶剂沉淀法	200
6.4	丹宁沉淀法	204
6.5	吸附法	207
6.6	喷雾干燥法直接制取粉末酶制剂	211
6.7	液体酶制剂	214
第7章	酶的精制	218
7.1	细胞破碎	218
7.2	离心技术	224
7.3	去除核酸	232
7.4	脱盐与浓缩	234
7.5	超滤	240
7.6	离子交换层析	253
7.7	凝胶过滤	260
7.8	吸附法纯化酶蛋白	274
7.9	亲和层析	279
7.10	等电聚焦	301
7.11	聚丙烯酰胺凝胶薄层等电聚焦	307
7.12	聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳	313
7.13	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	321
7.14	免疫扩散和免疫电泳	326
7.15	酶的结晶	336
第8章	酶的固定化及固定化酶反应器	349
8.1	固定化酶	349
8.2	固定化酶的制备	350
8.3	固定化酶的活力及其他参数的测定	374
8.4	酶反应器类型的选择	378
8.5	结束语	383

第 1 章 绪 论

胡 学 智

1.1 酶制剂工业的发展概况

酶是活细胞所产生的一种生物催化剂。生物体内的新陈代谢,其大部分的化学变化,是在酶的参与下,有控制地、有序地进行的,所以没有酶就没有新陈代谢,也就没有生命活动。生物界的一切物质,都有着催化它的形成和分解的酶类存在。有机物的发酵与腐败均是微生物通过它所生成的酶来进行的,所以酶的催化作用,自古以来就被人类应用于日常生活。远在人类进入游牧生活时期,已利用动物的胃液来凝固牛奶,制造奶酪。龙山文化遗址的考证,表明我国在四千年前劳动人民已掌握了酿酒技术。商朝酿酒业已很发达。周朝(二千七百年前)已出现用豆制酱。秦汉前麦芽已用于制饴糖。古人还用粪便供兽皮脱毛、制造皮革,用胰脏软化皮革等等,都是酶的作用。酶的作用还被用于治病;二千五百年前人们已懂得酒曲可治肠胃病,古代还用鸡内金(鸡胃膜)治消化不良。古书中记载了不少有关这方面的事例,如《诗经》“若作酒醴尔唯曲蘖”,《周礼天官篇》“膳夫掌王馈食酱有百二十瓮”,“王之膳羞共饴盐”,元《六书考》“以米蘖煎材为白饴也”……。用酶治病的记载如《左传》鲁宣公 12 年(前 597 年)申叔展问还无礼“有麦曲乎,曰无,叔展曰河鱼腹疾,奈何”。宋《重修政和经史 备用本》“曲味甘,大暖,疗藏府中风气,调中下气,开胃消宿食”……。说明了古代我们的祖先,在那时即使还不知道什么是酶,已凭着实践所累积的丰富经验,广泛应用着动植物与微生物酶的催化作用,以生产生活资料和治病。直到十九世纪前后,人们通过对胃肠的消化作用、麦芽的淀粉糖化作用和酵母酒精发酵的研究,才建立了酶的概念。1783 年 Spallanzani 发现食物在胃中的消化是靠胃液的作用,而不是由于机械磨碎作用。1833 年 Payer 等人用酒精从麦芽浸出液中沉淀出淀粉酶(diastrase),可使 2000 倍的淀粉分解,不久用于棉布退浆。1874 年,丹麦首先出现了出售凝乳酶的商品广告。那时虽然人们已经知道发酵与腐败,是由于活的微生物所致,但直到 1897 年 Büchner 发现酵母的无细胞抽提液,同样可引起蔗糖的酒精发酵,从而知道,酶不仅由活细胞所产生,而且从细胞分离以后仍可以继续发生作用,这些发现导致了酶的商品生产。1894 年高峰让吉首先用米曲霉固体培养法生产“他卡”淀粉酶,作为消化剂。1908 年 Röhm 利用胰酶鞣制皮革,还用于洗涤剂中。1911 年 Wallerstein 利用木瓜蛋白酶防止啤酒混浊。1917 年法国 Boidin 与 Effront 首创以枯草杆菌生产淀粉酶,在纺织工业上用作退浆剂。但是直到第二次世界大战后,随着抗菌素工业的发展,1949 年日本开始采用深层培养法生产细菌 α -淀粉酶后,微生物酶制剂的生产才进入了大规模工业化的阶段。由于酶的工业提纯技术的进步,和 α -淀粉酶、蛋白酶的广泛应用,果胶酶、转化酶、葡萄糖氧化酶等也相继进行工业化生产,1959 年酶法生产葡萄糖又获成功,迎来了酶制剂工业的大发展。此

表 1.1 酶制剂的种类、来源与用途

酶 的 名 称	来 源	用 途
碳水化合物水解酶: α -淀粉酶 (3, 2, 1, 1)	枯草杆菌、米曲霉、麦芽、黑曲霉	织物退浆、酒精及其他发酵工业液化淀粉、糖果、酿酒、消化剂
β -淀粉酶 (3, 2, 1, 2)	麦芽、大豆、麸皮、微生物(巨大芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌、吸水链霉菌)	与异淀粉酶同用以麦芽糖制造, 蒸饼防止老化
葡萄糖淀粉酶 (3, 2, 1, 3)	根霉、黑曲霉、内孢霉、红曲霉	制造葡萄糖、发酵工业、酿酒作为糖化剂
异淀粉酶 (3, 2, 1, 68) 及茁霉多糖酶 (3, 2, 1, 41)	假单胞杆菌、产气杆菌属	制造麦芽糖(与 β -淀粉酶合用), 制造直链淀粉, 淀粉糖化
纤维素酶(3, 2, 1, 4)	绿色木霉、曲霉	消化植物细胞壁, 饲料添加剂, 抽提植物成份
半纤维素酶	曲霉、根霉	同上
转化酶 (3, 2, 1, 26)	啤酒酵母、假丝酵母	糖果工业
右旋糖酐酶 (3, 2, 1, 11)	青霉、曲霉、赤霉	分解葡聚糖防止龋齿(研究中), 制麦芽糖
密二糖酶 (3, 2, 1, 22)	紫红被孢霉	提高甜菜糖回收率
柚苷酶	黑曲霉	去除桔汁苦味
橙皮苷酶	同上	防止温州蜜桔汁混浊
花青素酶	同上	桃子、葡萄脱色
果胶酶 (3, 2, 1, 15)	木质壳霉、黑曲霉(与果胶酯共存) (3, 1, 1, 11)	果汁澄清, 果实榨汁, 植物纤维精炼
α -葡萄糖苷酶 (3, 2, 1, 20)	黑曲霉	酒类制造, 制特种水馅
β -半乳糖酶 (3, 2, 1, 23)	曲霉、大肠杆菌	治不耐乳糖症, 炼乳脱乳糖
蛋白酶类: 放线菌蛋白酶	链霉菌	食品加工, 调味品制造, 制革工业
细菌蛋白酶	枯草杆菌、赛氏杆菌、链球菌(3, 4, 21, 14)(3, 4, 24, 4)	洗涤剂、皮革工业脱毛软化、丝绸脱胶、消化剂、消炎剂、清创、溶解坏死组织、活化透明质酸酶
霉菌蛋白酶	米曲霉、栖土曲霉、酱油曲霉 (3, 4, 21, 14)(3, 4, 24, 4)	消化剂、食品加工、皮革工业(脱毛软化)、毛皮工业、蛋白质水解、调味品制造、防止酒类混浊
酸性蛋白酶	黑曲霉、斋藤曲霉根霉、担子菌、青霉 (3, 4, 21, 14)(3, 4, 24, 4)	毛皮软化、啤酒澄清、消炎化痰、消化、羊毛染色
微生物凝乳酶 (3, 4, 23, 6)	微小毛霉	干酪制造
链激酶	链球菌	清创

续表 1.1

酶 的 名 称	来 源	用 途
植物蛋白酶	木瓜酶 (3, 4, 22, 2) 无花果 (3, 4, 22, 3) 菠萝 (3, 4, 22, 4)	防止啤酒混浊, 食肉软化, 消炎剂, 驱蛔虫
动物蛋白酶	胃蛋白酶 (3, 4, 4, 1) 胰蛋白酶 (3, 4, 21, 4) 糜蛋白酶 (3, 4, 21, 1) 胰血管舒张素 (3, 4, 21, 8) 羧肽酶 透明质酸酶 (3, 4, 21, 7) 尿激酶 (3, 4, 21, 31) 凝血酶 (3, 4, 21, 5)	消化剂, 猪仔饲料添加剂 消化剂, 皮革软化剂 消炎剂 治高血压症 消炎 去除血栓 止血
脂肪分解酶: (脂肪酶) (3, 1, 1, 3)	胰脏、黑曲霉、根霉、核盘霉、镰刀霉、地霉、子山单	消化剂、试剂
核蛋白脂肪酶 (3, 1, 1, 34)		黄油增香油脂定量
核酸分解酶: 核糖核酸酶 (2, 7, 7, 16) 脱氧核糖核酸酶 (3, 1, 4, 5) 多核苷酸磷酸酶 (2, 7, 7, 8) 磷酸二酯酶 (3, 1, 4, 1) 氧化还原酶 过氧化氢酶 (1, 1, 1, 6) 葡萄糖氧化酶 细胞色素 C 尿素酶 (1, 7, 3, 3)	胰脏 黑曲霉、枯草芽孢杆菌、链球菌、大肠杆菌 溶壁小球菌、固氮菌 固氮菌、放线菌、米曲霉、青霉 黑曲霉、青霉 肝脏 青霉、黑曲霉 牛、马的心肌、酵母 肾脏 产阮假丝酵母	试药 试药 试药 制造调味品与 AMP 脱氨酶并用由 RNA 制 5'-IMP 5'-GMP 去除过氧化氢 医药 葡萄糖定量, 测定尿糖、血糖, 食品去氧 医药、试剂 测定尿酸
L-氨基酸氧化酶 (1, 4, 3, 2) D-氨基酸氧化酶 (1, 4, 3, 3)	肾脏、细菌 肾脏、细菌	氨基酸定量 氨基酸定量
胆固醇氧化酶	<i>Mycrobacterium cholestereum</i>	胆固醇定量
其他酶: 葡萄糖异构酶 (5, 3, 1, 5)	放线菌、凝结芽孢杆菌、短乳酸杆菌、游动放线菌、节杆菌	葡萄糖异构化制果糖
溶菌酶 (3, 2, 1, 17)	卵白	医药消炎剂, 食品防腐剂, 试剂
青霉素酶 (3, 5, 2, 6)	蜡状芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌	分解青霉素

续表 1.1

酶 的 名 称	来 源	用 途
青霉素酰胺酶 (3, 5, 2, 11)	霉菌、放线菌	制 6-氨基青霉烷酸 (6-APA)
β -酪氨酸酶 (1, 10, 3, 1)	中间埃希氏杆菌	制 L-多巴
氨基酸酰化酶 (3, 5, 1, 14)	霉菌、细菌	DL-氨基酸拆分用
延胡索酸酶 (4, 2, 1, 2)	短杆乳酸菌	由延胡索酸制苹果酸
天冬氨酸酶 (4, 3, 1, 1)	大肠杆菌、假单胞杆菌	由延胡索酸制天冬氨酸
色氨酸合成酶 (4, 1, 1, 15)	菌类细胞	由吲哚与丝氨酸生产色氨酸
天冬酰胺酶 (3, 5, 1, 1)	霉菌、细菌	治疗白血病
谷氨酸脱羧酶 (3, 5, 1, 1)	植物、大肠杆菌	谷氨酸定量, 制 γ -氨基丁酸
环糊精葡萄糖基转移酶 (2, 4, 1, 19)	软化芽孢杆菌 巨大芽孢杆菌	制环糊精

注 () 为国际酶学委员会编号。

上表主要取材于小卷利章: 化学经济 (1977), 27 (11) 8 (1980)。

后又相继发展了脂肪酶、微生物凝乳酶、柚苷酶、磷酸二酯酶生产 5'-核苷酸、天冬氨酸酶生产天冬氨酸等等。60 年代中期, 欧美各国用蛋白酶加入洗涤剂, 曾风行一时, 刺激了许多国家竞相生产, 可是由于传说这种加酶洗涤剂可能引起过敏, 一度曾使这种世界性的流行突然终止, 以致生产酶制剂的工业不得不转向生产抗菌素, 给抗菌素市场带来巨大冲击。

近十几年来, 随着酶的应用技术的发展, 先后又开拓了用于制造 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 的青霉素酰胺酶、用于 DL-氨基酸拆分的氨基酸酰化酶, 分解 α -1, 6-葡萄糖苷键的异淀粉酶、利用微生物葡萄糖异构酶生产异构糖、利用蜜二糖酶增加甜菜糖的收率、治疗白血病的天冬酰胺酶、利用 β 酪氨酸酶生产 L-多巴 (DOPA) 等等。

1926 年 Sumer 从刀豆提取脲酶结晶成功, 证明酶本质上是一种蛋白质, 为蛋白质化学与酶化学奠定了基础。作为分子生物学的基础酶化学的研究, 同医学、生物学、农业、酿造以及食品工业之间的关系愈来愈密切, 因而深受人们的重视。随着广泛使用了层析技术, 超离心分离, 紫外、红外分析, 标记同位素示踪, 旋光弥散, X 射线衍射, 核磁共振等近代分离与检定的手段, 使许多酶得以制成单一纯蛋白质, 大大促进了对酶的物化性质的研究, 从而使酶化学有更大的发展。1956 年以来先后阐明的有核糖核酸酶、溶菌酶、枯草杆菌蛋白酶、木瓜蛋白酶等十多种酶的一级结构和若干酶的高级结构, 对于搞清酶的功能与作用机制、同底物结合的方式等提供了重要的资料。此外酶的化学修饰、酶的生物合成和代谢调节, 以及酶的人工合成与模拟等方面也有很大的进展。例如合成了牛胰核糖核酸酶, 由 L-色氨酸、丙氨酸与 L-谷氨酸合成了具有糖苷酶活性的 Phe 90-Glu 10 等共聚体。

由于遗传学和化学工程的迅速发展, 进一步促进了酶的生产与应用。固定化酶的广

泛研究,更扩大了酶的使用价值。

从生物界发现的酶已达 2500 多种,其中数百种已得到结晶,虽然工业上有用的酶还仅仅 50 多种(表 1.1),而大量工业生产的酶仅十数种,且大多属于水解酶,但新的有应用价值的酶种正在不断开发,酶制剂的应用范围已经涉及到许多领域。

工业上重要的酶主要是淀粉酶和蛋白酶,其次是葡萄糖异构酶、果胶酶、脂肪酶、葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶、乳糖酶等。其他许多少量生产用于分子生物学研究或医学、分析检验的酶如多核苷酸磷酸化酶、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、DNA 聚合酶、限制性内切酶以及 L-天冬酰胺酶、糖激酶、各种脱氢酶、脱羧酶等等也具有一定重要价值。

1.2 酶制剂工业在国民经济中的重要性

酶制剂工业所以迅速发展,这是由于酶用作催化剂具有以下独特的优点:

(1) 可在常温常压和温和的酸碱度下,高效地进行催化反应,有利于简化设备,改善劳动条件和降低成本。

(2) 酶催化所需的活化能极低,催化效率远比无机催化剂为高,例如 1 克 α -淀粉酶结晶,在 65℃ 15 分钟可使二吨淀粉转化为糊精(200 万倍),若用酸水解,须在 140—150℃ 高压耐酸设备中进行。

(3) 酶对作用底物有严格的专一性,因此可以从复杂的原料中加工某一成分,以制取所需的产品。或者从某种物质中去除不需要的杂质而不影响其他成分。例如啤酒中的蛋白质混浊可用蛋白酶去除,桔汁中的苦味成份(柚苷)可用柚苷酶分解而不影响风味,有些光学异构体,一般化学反应是很难区别的,但利用酶可以从消旋混合物中选择性地催化某一异构体,故可用于 DL-氨基酸的拆分。

(4) 酶本身是蛋白质,无毒,对酸碱度极为敏感,故可以简单地用作调节酸碱度,改变反应温度或添加抑制剂等办法来控制酶反应的进行。

(5) 酶的来源广泛,一些动植物和微生物都可以作为某些酶的原料。例如用动物胰脏和麦芽可提取淀粉酶,从动物胃膜、胰脏、木瓜、菠萝、无花果等可提取蛋白酶。尤其是微生物,由于生产不受季节、气候和地域的限制。微生物种类繁多(确知的菌种已不下 30 余万种),它的细胞可以生产全部新陈代谢所需要的酶类。一切动植物生产的酶几乎皆可以由微生物制取。由于微生物容易培养,繁殖又快,产量又高,故可以在短时间内廉价地大量生产。例如用枯草杆菌生产蛋白酶时,在良好的条件下,从 1 升发酵液可以制成 2 克蛋白酶结晶。若从牛胰来提取,则提取 1 克胰蛋白酶结晶就需数十头牛的胰脏。又因微生物容易变异,通过变异或培养条件的改变可以增加酶的产量和使酶的性质更适合人们的需要。

因此在食品、酿造、纺织、制革、造纸、医学、畜牧、日化以至废水处理,清洁下水道等诸多方面有着广泛的用途。在工业上酶制剂的应用,对于简化设备和工艺、改善劳动条件、提高产品质量、降低原料消耗都取得了显著的成效。如 α -淀粉酶用于织物退浆、蛋白酶用于丝绸脱胶,对于节约用煤与化工原料、提高工效,增强织物牢度效果十分明显。由于利用蛋白酶脱毛,以及用蛋白酶软化皮板,从而大大节约原料,缩短生产期,提高产品质量,

增加得率,改善劳动条件,减少污水排放,这些对皮革和毛皮工业都有了重大的改观。酱油酿造与饴糖工业,由于利用了 α -淀粉酶代替麦芽和麸曲的结果,还节约大量的粮食。葡萄糖淀粉酶的研究成功,彻底革除了葡萄糖生产的高温高压的酸水解工艺,使淀粉得糖率由 80% 增加到 100% 以上。由于这种改革使日本 1960 年的精制葡萄糖的生产量猛增十倍。在抗菌素生产上,使用青霉素酰胺酶裂解青霉素,制成 6-氨基青霉烷酸,再合成种种抗耐药性菌的新型青霉素,使一度衰落的青霉素工业重新繁荣起来。近十年来由于葡萄糖异构酶的开发,和葡萄糖异构酶固定化技术的成功,工业上异构糖浆的大规模生产,使传统的食糖资源结构发生了改变。

酶在有机化学和制药工业中有着重要的用途,利用化学合成和酶催化相结合的方法来制造产品,这对于减少设备投资、节省能源、减少公害等带来了许多好处。这种生产工艺是结合了化学工业与生物化学的长处而建立起来的。利用化学合成法完成简单的反应或生产分子结构不复杂的产物,而将结构复杂或反应困难的步骤留给生物催化法去完成。这种分工可以简化工艺,提高收率,减少副产反应而降低生产成本。例如以化学合成的延胡索酸为原料,经天冬氨酸酶的催化,生成 L-天冬氨酸。又如赖氨酸的生产,可用 D- α -氨基己内酰胺为原料,经无色杆菌 (*Achromobacter obae*) 氨基己内酰胺消旋酶转化为 L-氨基己内酰胺,再经隐球酵母 (*Cr. laurentii*) L-氨基己内酰胺水解酶水解而生成 L-赖氨酸。化学合成的氨基酸是 DL-型体,其中只有 L-型体有生理价值,这种消旋体的光学拆分是合成法生产氨基酸的一个重要步骤,用酶法拆分最为便利。此外在利用延胡索酸酶使延胡索酸转变成 L-苹果酸。核苷酸的制造, L-Dopa 和甾体激素生产上都广泛使用了酶催化的生产方法。在世界上能源不足的今天,这种能够在常温常压下进行反应的工艺愈来愈引起人们的注意,这样的工艺在今后将是化学工业中的一种重要手段。

固定化酶的研究是近 20 年来生物化学领域中最突出的成就之一,已有许多酶被作成了固定化酶。1969 年固定化氨基酰化酶首先在工业上用于连续拆分 DL-氨基酸以制造 L-氨基酸。此后用固定化青霉素酰胺酶生产 6-氨基青霉烷酸,用固定化天冬氨酸酶转化延胡索酸制天冬氨酸,以及用固定化延胡索酸酶催化延胡索酸制 L-苹果酸等都相继完成了工业化。尤其是固定化葡萄糖异构酶连续化生产异构糖浆,是固定化酶工业应用规模最大,最为成功的一个例子。1980 年世界上使用了 1300 吨固定化异构酶,生产了 200 万吨异构糖浆。最大的工厂日处理葡萄糖达到 2000 吨。工业上使用固定化酶进行催化反应,具有许多优点。由于酶不溶于水,产物的提纯分离大为简化;用于食品加工,不影响风味。酶在固定化后,稳定性增加,可供长期使用和连续反应,从而使产品质量稳定,工厂规模减小,自动化程度增加。

酶在医学上除淀粉酶、蛋白酶很早就用作消化剂外,蛋白酶在治疗炎症性疾病方面极有价值,由此发展的酶疗法,是医学上的一种重要手段。乳糖酶可治吃奶后的腹泻。微生物溶血酶、链激酶可治血栓。凝血酶可以止血。DNA 聚合酶可用于放射病治疗。脂蛋白脂肪酶治疗动脉硬化。尿酸酶治痛风。天冬酰胺酶可治白血病。苯丙氨酸羟化酶可治苯丙酮尿症(痴呆症)。将这些酶作成微型胶囊固定化酶后注射,由于酶不同体液直接接触,无抗原抗体反应,疗效持久。将尿酶作成微型胶囊后,用于肾功能不全的病人,可以代替庞大的透析机,以分解血液中尿素。

酶在分析化学与临床诊断上非常有用,方法灵敏,专一性强,结果精确。如谷氨酸脱

羧酶可用于测定谷氨酸,用葡萄糖氧化酶、过氧化物酶作成的试纸,可迅速测定血糖、尿酸。固定化葡萄糖氧化酶与过氧化物酶系统可用于葡萄糖的自动分析,这种装置一小时可完成 60 个样品的测定。尿酸酶与过氧化物酶作成的固定酶,可供尿酸之自动测定。其他如固定化乳酸脱氢酶用于乳酸测定等等。这些酶法分析是现代化分析化学与临床诊断的有力助手。

以上说明酶制剂工业对于促进国民经济的发展,具有重要意义,酶制剂生产的专业化构成了一门新兴工业,其价值日益受人重视,有关酶的问题已成为历届国际有关会议的中心议题。1972 年美国科学基金会将酶技术的研究列为“国家需要研究”的十六个项目之一,英国、日本、苏联等对酶制剂工业的发展都作了专门的规划,尤其日本对酶制剂工业的发展研究尤为积极,各种酶的开拓都居于领先。

1.3 我国的酶制剂工业

我国的酶制剂工业是在解放后逐渐发展起来的。早期是用动植物组织提取胃蛋白酶、胰酶和麦芽淀粉酶等作为消化剂或其他用途,规模小,产量少。

50 年代初,一些科研单位对微生物淀粉酶、蛋白酶的生产与应用作了探索。在酒精、酱油等发酵研究的基础上,转向酶制剂的生产和应用的研究。先后对下列的研究如米曲霉 α -淀粉酶的制造,细菌 α -淀粉酶用于棉布退浆与酒精生产,霉菌蛋白酶用于蛋白胨制造,皮革工业上用于脱毛,细菌蛋白酶用于胶卷和丝绸脱胶等等,都取得了一定成果。1965 年轻工业部在无锡投资建立酶制剂厂,开始商品生产细菌淀粉酶。1966 年枯草杆菌 1.398 中性蛋白酶又投产。1969 年浙江省投资开设国营温州发酵化工厂,生产栖土曲霉 3.942 蛋白酶。此后我国酶制剂的生产与应用日见普遍,应用范围也日益扩大,全国已经研究或生产了 60 多种酶(表 1.2—1.4),除工业上用途广泛的淀粉酶、糖化酶和蛋白酶已大量出产外,葡萄糖异构酶亦将占有重要的地位。此外在脂肪酶、纤维素酶、葡萄糖氧化酶、异

表 1.2 国内已投产或应用的酶制剂*
(约 26 个品种,其中 17 种为微生物酶)

品 种 (来源)	用 途
1. 细菌 α -淀粉酶 (BF 7658、JD32 枯草杆菌)	纺织品退浆;饴糖制造;酱油、食醋酿造;葡萄糖、异构糖浆、啤酒、酵母制造;石油开采
2. 霉菌 α -淀粉酶(米曲霉)	医药: 消化剂
3. 糖化酶(根霉、红曲、黑曲霉 UV-11、UV-11-111)	葡萄糖制造
4. 霉菌中、碱性蛋白酶(栖土曲霉 3.942)	皮革工业脱毛软化、毛皮软化,制蛋白胨,水解蛋白,肝宁硫酸软骨素,酵母膏,牛肉膏,丝绸脱胶,明胶制造
5. 霉菌酸性蛋白酶(黑曲霉 3.350, 宇佐美曲霉 537)	毛皮软化;皮革软化;羊毛低温染色;啤酒澄清;消炎退肿;化痰止咳
6. 放线菌蛋白酶(166 微白放线菌转换变种)	皮革脱毛
7. 细菌碱性蛋白酶(2709 地衣状芽孢杆菌, 209 短小芽孢杆菌, 289 短小芽孢杆菌)	皮革脱毛;丝绸脱胶;加酶洗涤剂;酶法制明胶
8. 细菌中性蛋白酶(1.398 枯草杆菌, 5114 枯草杆菌, 172 枯草杆菌)	皮革脱毛;柞蚕丝脱胶;废胶片回收片基

续表 1.2

品 种 (来源)	用 途
9. α -糜蛋白酶(牛)	医药上消炎消肿
10. 胰蛋白酶(牛、猪胰)	皮革软化;消化剂
11. 胃蛋白酶(猪胃膜)	消化剂
12. 羊胰蛋白酶结晶	医药: 消炎消肿(分外敷与注射二种)
13. 菠萝蛋白酶(菠萝)	医药上消炎消肿,啤酒澄清
14. 果胶酶(黑曲霉)	果汁澄清、水果加工
15. 葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶(青霉菌)	蛋白脱糖、试剂
16. 脂肪酶(假丝酵母)	皮革脱脂、绢纺脱脂
17. 葡萄糖异构酶(放线菌、游动放线菌、短乳酸杆菌)	制果糖浆
18. 溶菌酶(鸡蛋清)	医药、杀菌、防腐
19. 谷氨酸脱羧酶(大肠杆菌)	谷氨酸分析用,制 γ -氨基丁酸
20. 透明质酸酶(牛睾丸)	医药上消肿,促进药物扩散
21. 青霉素酰胺酶(大肠杆菌)	制 6'-氨基青霉素羧酸
22. 氨基酸酰化酶(霉菌)	消旋氨基酸拆分
23. 5'-磷酸二酯酶(枯青霉)	制 5'-核苷酸
24. 双链霉(链球菌)	消炎退肿
25. 链激酶(链球菌)	治疗静脉血栓
26. 天冬酰胺酶(大肠杆菌)	治疗白血病
27. 尿激酶	治血栓

* 上表根据作者调查编制。

表 1.3 试制中或尚未投产之品种

名 称	用 途
1. 纤维素酶(木霉、青霉)	食品、酿造、饲料加工
2. 胶原酶(梭状芽孢杆菌)	消炎、化脓
3. 多核苷酸磷酸化酶(大肠杆菌)	生产聚肌-胞抗癌药
4. 脱氧核糖核酸酶(霉菌)	制脱氧核苷酸
5. 天冬氨酸酶(细菌)	制天冬氨酸
6. 腺苷酸脱氨酶	制 5'-肌苷酸
7. 假囊酵母脂肪酶	黄油增香
8. 蜜二糖酶	分解棉子糖,甜菜制糖用
9. 右旋糖酐酶(霉菌)	防治龋齿,制糖工业
10. 磷酸单酯酶(麦芽根)	医药
11. 3'-磷酸二酯酶(固相)	
12. 弹性蛋白酶(猪)	治动脉粥样硬化
13. 异淀粉酶(产气气杆菌)	分解枝链淀粉、制直链淀粉,麦芽糖、啤酒酿造
14. 铜绿色假单胞杆菌蛋白酶(石油原料)	皮革工业
15. 黑曲霉碱性蛋白酶(石油原料)	皮革工业

淀粉酶等的研究上亦取得良好成效。

青霉素酰胺酶、天冬酰胺酶、链激酶、尿激酶、溶菌酶以及谷氨酸脱羧酶等各种试剂和医药用结晶酶都有了生产。

为了提高酶制剂的利用效果,我国还广泛研究了各种酶的固定化技术,在糖化酶、葡萄糖异构酶、氨基酰化酶、葡萄糖氧化酶、青霉素酰胺酶、天冬酰胺酶、5'-磷酸二酯酶等等的固定化技术均取得良好的进展。

对产酶微生物菌种,普遍采用了紫外线、 ^{60}Co γ 线、乙烯亚胺、亚硝基胍等物理与化学强烈因素进行诱变,已育成一批优良的变异菌株,用于工业生产。其中有 α -淀粉酶生产菌种枯草杆菌 BF 7658 变异株 18-209,糖化酶生产菌 UV-11, UV-11-111,蛋白酶生产菌栖土曲霉 3.942,短小芽孢杆菌 219-50,宇佐美曲霉 537 等等。

我国工业上生产的酶制剂已有30多种,这对生产技术的改造起了积极的推动作用,出现了一些工业必需酶制剂才能维持生产的局面。酶制剂的生产已成为我国社会主义经济建设中不可缺少的一个部门。由于基础较为薄弱,离开国际先进水平,还有不少差距,须要赶超。

表 1.4 试剂酶或结晶酶
(计 21 种,其中 6 种为微生物酶)

品 种 (来源)	品 种 (来源)
1. 醛缩酶(兔肌)	12. 结晶胃蛋白酶
2. 肌酸激酶(兔肌)	13. 核糖核酸酶(牛、羊胰)
3. 3-磷酸甘油醛脱氢酶(兔肌)	14. 链霉菌蛋白酶(链霉菌)
4. 己糖激酶(酵母)	15. α -淀粉酶结晶(细菌)
5. 白氨酸胺酶(猪腰)	16. β -淀粉酶(麦芽)
6. 黄嘌呤氧化酶(奶油)	17. 细菌蛋白酶
7. 乳酸脱氢酶(兔肌)	18. 脱氧核糖核酸酶(牛胰)
8. 精氨酸酶(牛肝)	19. 溶菌酶(鸡蛋)
9. 尿酶(巨豆)	20. 胰酶结晶
10. 过氧化物酶(辣根)	21. 胆碱酯酶
11. 羧肽酶(牛胰)	

1.4 酶制剂工业的发展方向

酶制剂的生产,推动了许多工业的发展,从自然界中发现的酶已有二千多种,但已开拓应用的还只是一小部分。不言而喻,开发应用的潜力是很大的。

由于酶的应用起源于食品酿造,因此酶制剂的最大应用对象仍是食品工业(表 1.2),其中蛋白酶、淀粉酶占主要地位。在美国蛋白酶的销售额最大几占全部酶制剂的 47%;淀粉酶次之,占全部酶制剂的 21% 以上;1975 年的总额为 5100 万美元,估计在 1975 至 1980 年 5 年中酶制剂的总销售额将增长 30%,达到 6600 万美元(表 1.5)。其中洗涤剂用碱性蛋白酶。葡萄糖异构酶、凝乳酶、 α -淀粉酶、糖化酶的需要量将明显增加。葡萄糖氧化酶和医药用酶制剂也将大幅度增长。在日本,1974 年的总产值 30 亿日元,产量为 12,700 吨。其中的 90% 是淀粉酶,蛋白酶次之,占 7—8%。在我国酶制剂的生产情况也大体相同,淀粉酶与蛋白酶几占 98% 以上。随着酶的大量廉价生产,新酶种新用途的不断开发,酶固定化技术的发展以及对酶的结构和功能的深入研究,包括酶的结构,酶的作用机制、活性中心和抑制剂等等,这些成就将被用于酶制剂工业上,用以改造酶的性质,提高其活性,增加其稳定性,从而使之更适合于应用,并进一步为酶的人工合成的研究打下基础。从经济上考虑,微生物酶不仅继续将被广泛应用,而且利用人工诱变选育优良产酶菌种将是今后提高产酶效能的一种重要手段。今后的重要课题将是应用遗传工程,按照人

表 1.5 美国主要酶制剂的用途及其销售金额估计*(万美元)

酶的名称	来 源	用 途	1971	1975	1980
细菌 α -淀粉酶	枯草杆菌	纺织物退浆,造纸,制葡萄糖,除去墙上糊纸,谷物加工发酵工业原料淀粉液化,洗涤等	460	800	850
霉菌 α -淀粉酶	米曲霉	玉米糖浆,消化剂,制面包	201	240	310
葡萄糖淀粉酶	臭曲霉,黑曲霉,海枣曲霉	葡萄糖制造,啤酒发酵工业原料糖化,苹果糖浆	170	210	260
果胶酶	黑曲霉,青霉	果汁加工,果酒澄清,蔬菜加工	256	300	350
转化酶	啤酒酵母	制造转化糖浆,防止蔗糖析出	10	20	20
纤维素酶	黑曲霉,木霉	消化剂,蔬菜加工饲料污水处理,造纸等	10	25	40
葡萄糖氧化酶	黑曲霉,青霉	蛋白去糖,罐头食品去氧,分析试剂	35	50	90
葡萄糖异构酶	链霉菌	制造苹果糖浆	100	300	600
霉菌蛋白酶	米曲霉	面包,饼干加工,蛋白水解物	76	82	91
细菌蛋白酶	枯草杆菌	洗涤剂	100	100	350
		饼干、面包,制革,胶卷,脱胶,蛋白水解物	83	100	130
胃蛋白酶	猪胃	消化剂,胶姆糖配方,制蛋白质发泡剂,饲料等,牛奶凝固剂,谷物加工	275	364	500
胰酶	胰脏	医药,制革工业,食品加工	80	80	80
木瓜酶	木瓜	肉嫩化,啤酒澄清医药蛋白水解物	470	510	510
凝乳酶	小牛胃,毛霉	制干酪	750	1200	1500
医用酶		诊断研究,消炎等	550	730	980
脂肪酶	动物,微生物	乳品增香,洗涤剂用	10	20	20
总 计			3635	5131	6681

* 上表根据佐藤友太郎: 食品工业17(22)57;(24)41(1974);18(27)56(1975);入江淑郎: *New Food Industry* 19(12) 7(1977) 整理。

们的意志对微生物实行改造和控制,定向的创造新种,使之更符合我们要求生产所需的那些酶类。目前,这种研究在改善枯草杆菌 α -淀粉酶的生产性上已跨出了可喜的一步。

工业上有发展前途的几种酶制剂如异淀粉酶用于制造直链淀粉,后者在食品工业上将具有重要价值。此外微生物 β -淀粉酶与异淀粉酶用于水解淀粉制麦芽糖, β -葡聚糖酶用于啤酒工业(麦芽汁降粘),微生物细胞壁溶解酶用于医学与食品保藏,淀粉酶用于环糊精,蜜二糖酶用于甜菜制糖,以及乳糖酶用于乳制品工业等,都将得到发展。这些酶如作成固定化酶后应用,效果将更加优越。

酶在开发新的食品资源方面有很大用处,例如用非专一性蛋白酶可将蛋白质水解到氨基酸而不生成苦味肽,因此用其去水解非捕捞对象的鱼类,以制造可溶性鱼蛋白,增加人类蛋白质的来源。用于石油蛋白的处理,可去除异味恶臭。利用蛋白酶的转肽作用,可消除大豆酶水解物的苦味与豆腥。利用这种作用还可将甲硫氨酸拼接于大豆蛋白而增加其营养价值。此外开发高活性的纤维素酶用以水解地球上最丰富的碳水化合物——纤维素,作为发酵工业碳源,利用微生物氧化还原反应建立生物电池等也是有待努力的方向。

为了适应工业上不同的用途,还需要发展耐热、耐碱、耐酸性的各种酶类。随着固氮酶的深入研究,利用酶法廉价生产氮肥的现实将不是遥远的事。将石油化工、化学工业、~~橡胶~~工业等需要高温高压的技术,转变为常温低压的生产工艺对酶制剂工业也寄以希望。

酶在环境保护方面,可能发挥其作用。例如用胆碱脂酶检查空气中的神经毒剂,用酶分解废水中的酚类,分解有机汞,处理含氰废水,分解有机硫、脱氮以及分解丙烯酰胺等等的研究都取得瞩目的进展。酶也可用在高分子有机化合物、塑料、农药以及石油废弃物的分解上。此外利用固定化酶处理饮用水去除酚与多环芳香物质等等的研究也很有希望解决。

固定化酶的研究给工业生产带来了很大益处,但是存在的问题是尚缺少一种普遍适用的固定化方法和廉价的载体,目前许多研究正在进行这种探索。由固定化酶基础上发展的亲和层析,是分离纯化生理物质的高效而简便的手段,这种方法可以一步从溶液中高效率的将物质提纯千百倍,将成为今后工业上提取酶,辅酶,酶抑制物的有力工具。

随着固定化酶技术的发展,已有可能将多种固定化酶装在同一柱中进行多酶反应。例如将淀粉酶、糖化酶、异构酶同柱顺序反应转化淀粉为果糖的设想,将糖酵解的全部酶作成固定化酶,从葡萄糖直接生产酒精等。随着生物体能源、ATP 可用发酵法或合成法廉价制造。由需要辅酶和再生辅酶系统的固定化多酶反应器来模拟生物体的多酶催化功能将成为现实。届时用分解代谢有关的酶作成反应器,将取代今天庞大而低效的微生物发酵罐,这种高效,而无公害,可长期自动连续化反应的生产工艺,将使发酵工业和化学工业的面貌发生根本变革。但是由于合成各种物质的酶反应机制是非常复杂的,故在可见的将来,实用上这样的工艺,也许还只能采用固定化微生物细胞来完成。用固定化短杆菌细胞,就可以由糖与氨合成谷氨酸。用固定化酵母细胞连续生产 ATP。固定化青霉菌和枯草杆菌生产青霉素,杆菌肽等等。

微生物酶制剂工业是一门新兴的工业,是综合了科技领域中多方面成就的边缘科学,作为生命科学的一环,在未来的工农业生产和医学中将会发挥估计不到的贡献。随着科学的发展,它将为未来的工农业生产和医学事业带来新的飞跃。

参 考 文 献

- [1] Brinton, M. Miller et al.: Industrial Microbiology MC Graw Hill Book Co. p. 129, 1977.
- [2] 入江淑郎: *New Food Industry* **19**(12), 7(1977).
- [3] 小卷利章: *New Food Industry* **19** (11), 2 (1977).
- [4] 西沢一俊: 酵素分子生物学 南江堂 (1973).
- [5] Gerald Reed: *Enzymes in food Processing* Academic Press (1975).
- [6] 千田一郎: 发酵と工业 **35**(4), 13—24 1977.
- [7] 小卷利章: 化学经济 **24**(10), 23, 1977; **27**(1), 1980.
- [8] 佐藤友太郎: 食品工业 **17**(22), 57; (24), 41(1974). **18**(27), 56, (1975).
- [9] 上林明: 别册化学工业 **17**(8), 13(1973).
- [10] 小林恒夫: 别册化学工业 15—5(1971).
- [11] 福本寿一郎: 近代工业化学, 23 卷 p.1—116 朝倉书店 1968.
- [12] 上海植物生理研究所: 微生物学报 **15**(4)263(1975).
- [13] Jeanne, C. Johnson: *Industrial Enzymes Recent Advances* Noyes Data Corp. (1977).
- [14] 刘 信: 应用微生物 1979 No. 1. p. 10.