

高职高专系列教材

GAOZHI GAOZHUAN
XILIE JIAOCAI

酶制剂 生产与应用

MEIZHIJI SHENGCHAN YU YINGYONG

杨昌鹏 主编

中国环境科学出版社

高职高专系列教材

酶制剂生产与应用

MEIZHIJI SHENGCHAN YU YINGYONG

杨昌鹏 主编

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

酶制剂生产与应用/杨昌鹏主编. —北京: 中国环境
科学出版社, 2006.8

(高职高专系列教材)

ISBN 7-80209-318-X

I. 酶… II. 杨… III. ①酶制剂-生产工艺-高等
学校: 技术学校-教材 ②酶制剂-应用-高等学校:
技术学校-教材 IV. TQ464.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 088623 号

责任编辑 张玉海 孟亚莉

责任校对 尹 芳

封面设计 陆 臻

出版发行 中国环境科学出版社
(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.cn>
联系电话: 010-67112765 (总编室)
发行热线: 010-67125803

印 刷 北京东海印刷有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2006 年 8 月第 1 版
印 次 2006 年 8 月第 1 次印刷
印 数 1—3000
开 本 787×960 1/16
印 张 17.5
字 数 333 千字
定 价 22.00 元

【版权所有。未经许可请勿翻印、转载, 侵权必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

高 职 高 专 系 列 教 材

编 写 委 员 会

北京农业职业学院

赵晨霞 李玉冰 王晓梅 周珍辉

江苏畜牧兽医职业技术学院

葛竹兴 刘 靖 曹 斌 高勤学 朱善元

锦州医学院畜牧兽医学院

曲祖乙 王玉田

黑龙江生物科技职业学院

王 鹏 蔡长霞 马贵民

广西农业职业技术学院

杨昌鹏

杨凌职业技术学院

马文哲

江西生物科技职业学院

徐光龙

上海农林职业技术学院

张 江

高 职 高 专 系 列 教 材

审 读 委 员 会

江苏食品职业技术学院	贡汉坤
杨凌职业技术学院	陈登文 陈淑茗
黑龙江农业经济职业学院	杜广平 张季中
苏州农业职业技术学院	潘文明 夏 红
吉林农业科技学院	孙艳梅
扬州大学兽医学院	秦爱建
复旦大学生命科学学院	黄伟达
中国农业大学实验动物中心	张 冰
中国绿色食品发展中心	张志华
国家环保总局有机食品发展中心	周泽江
江苏省兽药监察所	王苏华
江苏省农业科学院兽医研究所	戴鼎震

前 言

《酶制剂生产与应用》是根据《教育部关于加强高职高专教育人才培养工作的意见》、《关于加强高职高专教育教材建设的若干意见》等文件的精神，在中国环境科学出版社的组织领导下编写的。除供高职高专生物技术、食品生物技术、生物制药专业作为必修课教材外，亦可作为其他食品类专业、生物工程类专业的选修课教材，还可作为相关生产科技人员的参考用书或岗位培训教材。

本教材立足于现代生物技术专业专业课的层次，以酶的提取分离技术为主线，紧紧围绕酶制剂生产与应用的各个方面，简明扼要而又系统全面地阐述了酶制剂生产的基础理论、先进实用的生产技术及其酶制剂的应用领域，重点介绍了当前酶制剂生产的基本方法及其精制技术。通过理论学习和实训可使学生比较系统地了解酶制剂生产的方法和应用前景，能运用所学的基础理论和生产技术生产常见的酶制剂产品，并熟悉酶制剂在食品工业、环保、能源、医药、基因工程、细胞工程、动物饲养等领域中的应用，为今后从事酶制剂的生产与应用及其相关的科研工作奠定坚实的基础。

全书共分六章。除绪论外，其余五章均由必备的基础理论和丰富的实训（生产实例）两部分构成。本教材结构合理，内容充实，信息量大，与同类教材相比适应面广、体例新颖、图表丰富、实训突出、技术实用、可操作性强。全书涉及的内容尤其是实训内容丰富、覆盖面广，各院校可从

不同的教学计划的整体优化出发,结合自身的实训条件,根据需要有所侧重,进行相应的选择,挑选出最需要的部分组织教学,其余可作为拓宽学生知识的阅读材料。

本教材由广西农业职业技术学院杨昌鹏主编。参加本书编写的还有上海农林职业技术学院代书玲,锦州医学院畜牧兽医学院王芬,黑龙江生物科技职业学院刘中深,广西农业职业技术学院潘嫣丽,北京农业职业学院曹允。编写的具体分工是:杨昌鹏编写第一、三章,代书玲编写第二章、第五章第一节,王芬编写第五章第三节、第六章第五节,刘中深编写第六章,潘嫣丽编写第五章第二、四节,曹允编写第四章。第五章的实训部分由王芬编写,本书的其余实训部分均是由各相关章节的编者编写。全书由杨昌鹏统稿。

本教材承蒙复旦大学生命科学学院黄伟达教授主审,在此深表谢意!在编写过程中得到了广西农业职业技术学院、上海农林职业技术学院、锦州医学院畜牧兽医学院、黑龙江生物科技职业学院、北京农业职业学院的大力支持,在此表示衷心的感谢!

本教材在编写过程中,广泛参考和引用了众多专家、学者的著作和论文,限于篇幅不能一一列出,在此一并致以诚挚的谢意。

鉴于编者的知识水平有限,编写时间短促,难免有错漏之处,敬请各位同行、广大读者批评指正。

编 者

2006年6月

目 录

第一章 绪论.....	1
第一节 酶学基本知识.....	1
一、酶的组成.....	1
二、酶的命名与分类.....	2
三、酶催化作用的特点及其影响因素.....	4
四、酶活力的测定.....	7
第二节 酶的生产与应用概述.....	9
一、酶制剂生产的现状.....	9
二、酶制剂生产的基本方法.....	10
三、酶的应用概况与发展前景.....	10
第二章 粗酶制剂的生产技术.....	12
第一节 提取分离法产酶技术.....	12
一、细胞破碎.....	13
二、酶的抽提.....	16
三、酶的粗分离.....	19
第二节 微生物发酵法产酶技术.....	26
一、产酶微生物及其保藏.....	26
二、酶的发酵生产工艺.....	28
三、提高酶产量的措施.....	33
第三节 酶的浓缩、干燥与保藏.....	34
一、酶的浓缩.....	34
二、酶的干燥.....	35
三、酶制剂的保藏.....	36
本章实训.....	37
实训一 菠萝蛋白酶的制备及其活力测定.....	37
实训二 木瓜蛋白酶的制备及其活力测定.....	40

实训三 动物凝血酶的制备及其活力测定.....	45
实训四 果蔬中多酚氧化酶的提取及其活力测定.....	48
实训五 猪肾酰化酶 I 的制备及其活力测定.....	51
实训六 酵母发酵法制备超氧化物歧化酶 (SOD)	56
第三章 酶的精制技术	61
第一节 酶的膜分离技术.....	62
一、透析	62
二、超滤	63
第二节 酶的层析分离技术.....	69
一、离子交换层析.....	70
二、凝胶层析	75
三、亲和层析	80
四、疏水层析	84
第三节 酶的电泳分离技术.....	86
一、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)	86
二、等电聚焦电泳.....	91
第四节 酶的结晶技术.....	95
一、盐析结晶法	95
二、有机溶剂结晶法.....	95
三、透析平衡结晶法.....	96
四、等电点结晶法.....	96
本章实训.....	97
实训一 酶的透析分离技术.....	97
实训二 酶的超滤分离技术.....	100
实训三 凝胶过滤法脱盐技术.....	102
实训四 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离技术	107
实训五 层析法制备超氧化物歧化酶 (SOD)	112
实训六 胰蛋白酶的制备.....	117
实训七 鸡蛋溶菌酶的制备.....	120
实训八 胃蛋白酶的制备.....	125
第四章 酶的固定化与修饰	129
第一节 酶的固定化.....	129
一、酶的固定化方法.....	130

二、固定化酶的性质.....	134
第二节 酶分子的修饰.....	137
一、酶分子的化学修饰.....	137
二、酶分子修饰的应用.....	140
本章实训.....	143
实训一 多酚氧化酶的吸附固定化实验.....	143
实训二 酶活性的修饰实验.....	145
第五章 酶制剂的工业化生产实例.....	148
第一节 淀粉酶类的生产.....	148
一、 α -淀粉酶的生产.....	150
二、 β -淀粉酶的生产.....	153
三、葡萄糖淀粉酶的生产.....	155
第二节 蛋白酶类的生产.....	158
一、酸性微生物蛋白酶.....	159
二、中性微生物蛋白酶.....	163
三、碱性微生物蛋白酶.....	167
第三节 纤维素酶的生产.....	169
一、纤维素酶的性质和作用机理.....	170
二、生产菌种.....	173
三、纤维素酶的生产实例.....	174
第四节 果胶酶的生产.....	179
一、果胶酶的分类与性质.....	179
二、果胶酶的生产.....	181
本章实训.....	183
实训一 α -淀粉酶活力的测定.....	183
实训二 β -淀粉酶活力的测定.....	188
实训三 葡萄糖淀粉酶活力的测定.....	191
实训四 蛋白酶活力的测定.....	194
实训五 纤维素酶活力的测定.....	201
实训六 果胶酶活力的测定.....	206
第六章 酶制剂的应用.....	210
第一节 酶在食品工业中的应用.....	210
一、酶在食品保鲜方面的应用.....	211

二、酶在淀粉类食品生产方面的应用.....	213
三、酶在蛋白类食品生产方面的应用.....	217
四、酶在果蔬类食品生产中的应用.....	223
五、酶在食品添加剂生产中的应用.....	225
六、酶在改善食品品质与风味方面的应用.....	229
七、酶在食品分析与检测中的应用.....	230
第二节 酶在环保与能源方面的应用.....	231
一、酶在环境监测方面的应用.....	231
二、酶在废水处理方面的应用.....	232
三、酶在生物降解材料开发方面的应用.....	233
四、酶在乙醇生产方面的应用.....	233
五、酶在生物柴油制造方面的应用.....	234
第三节 酶在医药领域中的应用.....	234
一、酶在疾病诊断方面的应用.....	234
二、酶在疾病治疗方面的应用.....	239
三、酶在药物制造方面的应用.....	242
第四节 酶在基因工程与细胞工程中的应用.....	243
一、酶在除去细胞壁方面的应用.....	243
二、酶在大分子切割方面的应用.....	244
三、酶在分子拼接方面的应用.....	245
第五节 酶在饲料工业和养殖业中的应用.....	247
一、饲用酶制剂的种类和来源.....	247
二、饲用酶制剂的作用.....	247
三、饲用酶制剂的应用.....	249
四、饲用酶制剂的合理使用.....	250
本章实训.....	251
实训一 淀粉酶在果葡糖浆生产上的应用.....	251
实训二 淀粉酶在酒精生产中的应用.....	254
实训三 果胶酶在香蕉果汁生产中的应用.....	257
实训四 果胶酶在去柑橘囊衣上的应用.....	259
实训五 果胶酶在果酒澄清上的应用.....	261
实训六 蛋白酶在明胶生产上的应用.....	263
实训七 纤维素酶在动物饲料方面的应用.....	266
参考文献	269

第一章 绪论

【知识目标】

● 着重了解酶的组成、酶的命名与分类、酶催化作用的特点及其影响因素、酶活力定义与测定等酶学基本知识, 以及酶制剂生产的现状、应用概况与发展前景。

第一节 酶学基本知识

酶是一种生物催化剂, 是具有生物催化功能的生物大分子(蛋白质或 RNA)。自然界中的一切生命现象都与酶的活动有关系。生物体内的各种生物化学反应, 都是在酶的催化作用下进行的。如果离开了酶, 新陈代谢就不能进行, 生命就会停止。

酶的性质和功能真正被人们所认识只有百余年的历史, 但酶的催化作用自古以来就被人类应用于日常生活中。在 4 000 多年前, 我国夏禹时代就已知道用曲酿酒, 周朝已能制麦芽糖和造酱、醋, 至春秋时代, 就有用曲霉治腹泻的记载。酶的系统研究起始于 19 世纪中叶对发酵本质的研究。1926 年 Sumner 首次提取出脲酶, 并进行结晶, 提出酶的本质是蛋白质。

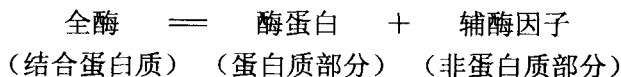
自从人们发现酶的化学本质是蛋白质以来, 已经知道生物体内存在着 8 000 多种具有不同功能的酶。其中, 被纯化为结晶的酶已有几百种以上, 并对其组成、作用机制等也有了深入的了解。

一、酶的组成

绝大多数的酶是蛋白质。具有酶催化活性的蛋白质按其组成可分为单纯蛋白质和结合蛋白质两类。

单纯蛋白质类的酶只由氨基酸组成, 不含任何其他物质, 大多数水解酶都属于单纯蛋白质类的酶。如胃蛋白酶、脲酶、木瓜蛋白酶等。

结合蛋白质类的酶除蛋白质部分外,还有非蛋白质部分,即辅因子。酶的辅因子可以是金属离子,也可以是小分子有机化合物。常见的酶含有的金属离子有 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 等。它们或者是酶催化活性的组成部分,或者是连接底物和酶分子的桥梁,或者在稳定蛋白质分子构象方面起作用。小分子有机化合物是一些化学性质稳定的小分子物质,其主要作用是在反应中传递电子、质子或一些基团。组成这类酶的蛋白质部分叫做酶蛋白,辅因子部分叫做辅酶或辅基。通常把那些与酶蛋白结合得比较松的、用透析法可以除去的叫做辅酶,把那些与酶蛋白结合得比较紧的、用透析法不容易除去的叫做辅基。酶蛋白和辅因子单独存在时,都没有催化活性,只有两者结合在一起,才能起到酶的催化作用。这种完整的酶分子叫做全酶。如乳酸脱氢酶、转氨酶。



二、酶的命名与分类

(一) 命名

1. 习惯命名法

现在普遍使用的酶的习惯名称是以下述 5 个原则来决定的。

(1) 根据酶催化反应的性质来命名。如催化水解反应的酶称为水解酶,催化氧化作用的酶称为氧化酶或脱氢酶,催化氨基移换反应的酶称为转氨酶。

(2) 根据酶作用的底物来命名。如催化淀粉水解的酶称为淀粉酶,催化蛋白质水解的酶称为蛋白酶,催化尿素水解的酶称为脲酶。它们的底物分别是蛋白质、淀粉和尿素。

(3) 将酶的作用底物与催化反应的性质结合起来命名。如催化葡萄糖进行氧化反应的酶称为葡萄糖氧化酶,催化乳酸脱氢反应的酶称为乳酸脱氢酶。

(4) 将酶的来源与作用底物结合起来命名。如酶作用底物分别为淀粉和蛋白质,来源于细菌时,分别称为细菌淀粉酶和细菌蛋白酶。

(5) 将酶作用的最适 pH 和作用底物结合起来命名。例如,酶作用底物为蛋白质,作用最适 pH 为中性的称为中性蛋白酶;最适 pH 为碱性的称为碱性蛋白酶。

酶的习惯名称使用起来比较方便,但由于缺乏统一的原则,所以会出现一酶多名或一名多酶,有些酶命名也不甚合理。

2. 系统命名法

鉴于新酶的不断发现,并为了避免名称的重复和混乱,1961 年国际生化学会酶学委员会规定了酶的系统命名法和分类原则。

按照国际系统命名原则,每一种酶具有一个系统名称和一个习惯名称。习惯名称应

简单, 便于使用。系统名称应标明酶的作用底物和反应的性质。如果有两种底物, 均需标出, 当中用“:”分开, 若其中一种底物是水, 则可省略。

例如: 谷丙转氨酶的系统命名称为“L-丙氨酸: α -酮戊二酸氨基转移酶”, 催化反应为: L-丙氨酸+ α -酮戊二酸 $\rightarrow$ 丙酮酸+L-谷氨酸。

又如: 乳酸脱氢酶称为“L-乳酸: NAD⁺脱氢酶”, 催化反应为: L-乳酸+ NAD⁺ $\rightarrow$ 丙酮酸+NADH+H⁺。

而蔗糖水解酶则称为“蔗糖酶”, 催化反应为: 蔗糖+水 $\rightarrow$ 葡萄糖+果糖。

(二) 系统分类及编号

1. 系统分类

国际酶学委员会制定了一套完整的酶分类系统, 主要根据酶催化反应的类型, 把酶分为六大类:

(1) 氧化还原酶类。指催化底物进行氧化还原反应的酶类。例如, 乳酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、过氧化氢酶、醇脱氢酶、多酚氧化酶等。

其反应通式为: $AH_2+B \rightarrow A+BH_2$

(2) 转移酶类。指催化底物之间进行某些基团的转移或交换的酶类。如转甲基酶、转氨酸、己糖激酶、磷酸化酶、谷丙转氨酶等。

其反应通式为: $A-R+B \rightarrow A+B-R$

(3) 水解酶类。指催化底物发生水解反应的酶类。例如, 淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、磷酸酶、蔗糖酶等。

其反应通式为: $AB+H_2O \rightarrow AOH+BH$

(4) 裂合酶类。指能从底物中移去某些基团(不是由于水解)而形成双键, 或加入某些基团于双键的酶类。例如, 柠檬酸合成酶、醛缩酶、脱水酶、脱羧酶等。

其反应通式为: $AB \rightarrow A+B$

(5) 异构酶类。指催化各种同分异构体之间相互转化的酶类。例如, 磷酸丙糖异构酶、消旋酶、葡萄糖异构酶等。

其反应通式为: $A \rightleftharpoons B$

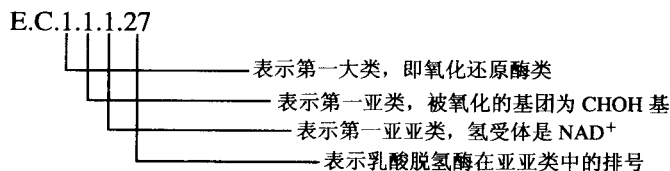
(6) 合成酶类。又称连接酶, 是指催化 2 分子底物合成为 1 分子化合物, 同时还必须偶联有 ATP 的磷酸键断裂的酶类。例如, 谷氨酰胺合成酶、丙酮酸羧化酶、氨基酸: tRNA 连接酶等。

其反应通式为: $A+B+ATP \rightarrow AB+ADP+P_i$

2. 编号

在每一大类中又可分为若干亚类, 每个亚类又分为若干亚亚类, 最后把属于每一个亚亚类的各种酶分门别类地按照顺序排好, 分别给每一种酶一个 4 位数字的编号。例如:

乳酸脱氢酶的编号为 E.C.1.1.1.27, 其编号可作下列解释, E.C.代表国际酶学委员会 (Enzyme Commission)。



而多酚氧化酶的编号为 E.C.1.10.3.1; 过氧化氢酶为 E.C.1.11.1.6; 过氧化酶为 E.C.1.11.1.7; 葡萄糖磷酸转移酶为 E.C.2.7.1.1; α -淀粉酶为 E.C.3.2.1.1。

系统命名严格而科学, 但名称太长, 使用起来不太方便, 所以酶的习惯名称仍被广泛使用。

三、酶催化作用的特点及其影响因素

(一) 酶催化作用的特点

1. 高效的催化性

酶是高效催化剂, 能在温和条件下, 例如, 常温、常压和近中性的 pH 条件下, 大大加速反应。在可比较的情况下, 酶的催化效率相对其他类型的催化剂而言, 可使反应速率提高千百万倍以上。

2. 高度的专一性 (特异性)

用酶催化时, 只能催化一种或一类反应, 作用一种或一类极为相似的物质。不同的反应需要不同的酶。酶的这种性质称为酶的专一性。被酶催化的物质称为该酶的底物或作用物。酶对底物的专一性通常分为以下几种:

(1) 绝对专一性。这种酶只作用于一种底物产生一定的反应, 称为绝对专一性。如脲酶只能催化尿素水解成 NH_3 和 CO_2 , 而不能催化甲基尿素水解。

(2) 相对专一性。这种酶可作用于一类化合物或一种化学键, 这种不太严格的专一性称为相对专一性。如脂肪酶不仅水解脂肪, 也能水解简单的酯类; 磷酸酶对一般磷酸酯都有作用, 无论是甘油的还是一元醇或酚的磷酸酯均可被其水解。

(3) 立体异构专一性。酶对底物的立体构型的特异要求称为立体异构专一性。如 α -淀粉酶只能水解淀粉中 α -1,4-糖苷键, 不能水解纤维素中 β -1,4-糖苷键; L-乳酸脱氢酶的底物只能是 L 型乳酸, 而不能是 D 型乳酸。酶的立体异构专一性表明, 酶与底物的结合, 至少存在 3 个结合点。

3. 酶活性的不稳定性

酶的作用要求一定的 pH、温度等较温和的条件，强酸、强碱、有机溶剂、重金属盐、高温、紫外线、剧烈振荡等任何使蛋白质变性的理化因素都可使酶变性而失去其催化活性。

4. 酶活性的可调节性

酶的催化活性受多方面控制，控制的方式很多，如抑制剂、共价修饰、反馈调节、酶原激活、激素控制等。

以上这些特性中，酶的高效性和专一性是其最为突出的特性。

(二) 影响酶催化作用的因素

酶与一般的催化剂相比，具有催化效率高、高度专一性和作用条件温和的特点。影响酶催化作用的主要因素有底物浓度、酶浓度、温度、pH、抑制剂及激活剂等。

1. 底物浓度

底物浓度是决定酶催化反应速度的主要因素。在其他条件相同的情况下，酶促反应速度与底物浓度有一定的关系（图 1-1），即在底物浓度较低的情况下，反应速度与底物浓度成正比，当底物浓度达到一定浓度时，反应速度趋向平衡，若底物浓度过高，反应速度反而降低。当反应速度达到最大速度一半时的底物浓度称为米氏常数（ K_m ）。大多数酶的 K_m 值在 $10^{-6} \sim 10^{-1} \text{mol/L}$ ， K_m 值可表示酶与底物的亲和力， K_m 值小表示亲和力大。

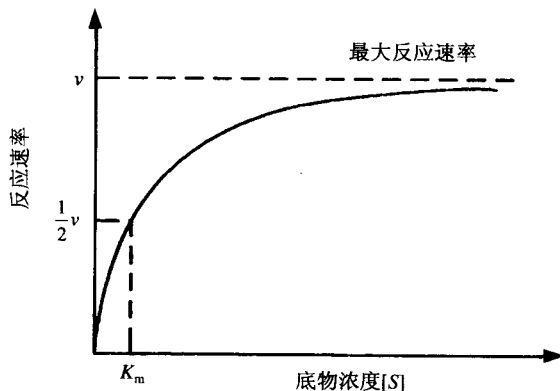


图 1-1 底物浓度对酶促反应速度的影响

2. 酶浓度

对大多数的酶促催化反应来说，在适宜的温度、pH 和底物浓度一定的条件下，酶促催化反应速度至少在初始阶段与酶的浓度成正比，这个关系是测定未知试样中酶浓度的依据。

3. 温度

每一种酶都有其各自的有效温度和最适温度。在酶的有效温度范围内，酶才能进行

催化作用，且在最适条件下酶的催化反应速度达到最大（图 1-2）。在一定的温度范围内，温度每升高 10°C ，酶促反应速度增加 $1\sim 2$ 倍。但温度过高时，会引起酶变性而丧失其催化活性。因此，绝大多数酶的提纯与干燥需在 5°C 以下的低温条件下进行。

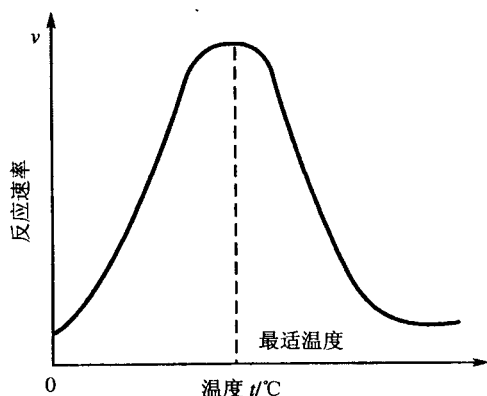
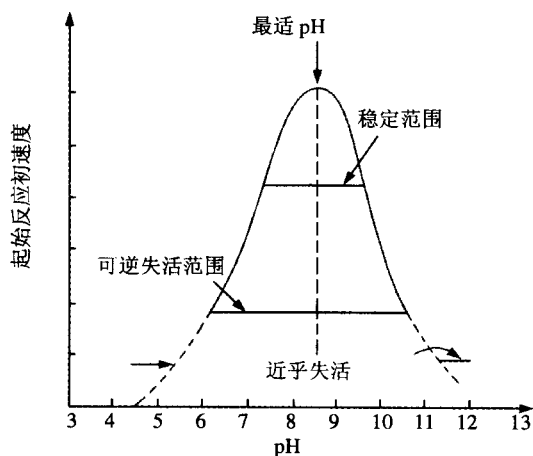


图 1-2 温度对酶促反应速度的影响

4. pH

酶的催化作用与反应液的 pH 有很大关系，每一种酶都有各自的有效 pH 和最适 pH。只有在有效 pH 范围内，酶才显示其催化活性，且在最适 pH 条件下，酶催化反应速度达到最大。在最适 pH 值的两侧酶活性都骤然下降，所以一般酶促反应速度的 pH 值曲线呈钟形（图 1-3）。



（引自《食品化学》，阚建全，2002）

图 1-3 pH 值对酶促反应速度的影响