

酶工程

(双语教材)

Enzyme Engineering

(Bilingual Textbook)

赵 蕾 编著



科学出版社

酶 工 程

Enzyme Engineering

(双语教材)

赵 蕾 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本教材是酶工程双语教学的配套教材,包括酶工程的理论教学与实验教学内容。全书力求简明扼要,采用多种形式将英文图表及专业英语融入其中。理论部分共8章,分别为绪论、酶的生产、酶的分离纯化、酶与细胞的固定化、酶分子的化学修饰、酶反应器、抗体酶与核酶、生物酶工程,各章均设有英文摘要、英文标题和图表、英文总结框图及英文思考题,对主要知识点以英文框(Box)的形式加以强化。实验部分为综合性实验,包括酵母蔗糖酶的纯化、酵母蔗糖酶的纯度测定、酵母蔗糖酶的固定化、固定化酵母蔗糖酶性质的研究、利用固定化酵母蔗糖酶制备果葡糖浆、酵母蔗糖酶活性功能基团的化学修饰,并有相应的英文概要。书后附主要参考文献、本书出现的专业词汇及中文对照。

本书可作为高等院校本科生或研究生酶工程双语教学教材,也适合研究生备考及教师参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

酶工程=Enzyme Engineering/赵蕾编著. —北京:科学出版社,2018.2
双语教材

ISBN 978-7-03-041158-7

I. ①酶… II. ①赵… III. ①酶工程-双语教学-高等学校-教材
IV. ①Q814

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第035431号

责任编辑:刘畅 孙青/责任校对:彭涛

责任印制:吴兆东/封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年2月第一版 开本:787×1092 1/16

2018年2月第一次印刷 印张:13

字数:308 000

定价:49.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

在经济日趋全球化的当今社会，培养具有国际视野和国际竞争力的人才，已成为高等教育的重要议题之一。高校双语教学的实施，是逐步实现教育与国际接轨的有效措施，学生在学习专业知识的同时，接触专业英文，有利于今后更好地开阔视野，应对挑战。

“酶工程”及“酶工程实验技术”是山东师范大学生命科学学院生物技术专业的必修课，自2009年开展双语教学以来，得到了广大学生的支持与厚爱，由于一些外版教材不能完全适应本课程的教学内容需求，加之普通院校大多数学生对全英文教材阅读有一定困难，以及外文书价较高的现实，教材问题一直未能得到有效解决。编写一本适合目前大学生英语水平，并对大学生系统地获得专业知识、扩大专业英文课外阅读有所帮助的双语教材，是本教材编写的宗旨与目标。

本教材编写的特点如下。

1. 基础理论与相关实验相结合

酶工程及其实验技术是生物技术专业中理论性较强、应用较广的学科分支，本教材将酶工程的理论知识作为第一部分，将与之对应的实验内容作为第二部分。理论部分共分8章，即绪论、酶的生产、酶的分离纯化、酶与细胞的固定化、酶分子的化学修饰、酶反应器、抗体酶与核酶、生物酶工程。实验部分为综合性实验，包括酵母蔗糖酶的纯化、酵母蔗糖酶的纯度测定、酵母蔗糖酶的固定化、固定化酵母蔗糖酶性质的研究、利用固定化酵母蔗糖酶制备果葡糖浆、酵母蔗糖酶活性功能基团的化学修饰，力求将理论部分的重要内容通过实验加以强化，并形成完整的实验体系。

2. 英文表述与中文主体相结合

本教材不是简单的中英文对照形式，而是在中文主体内容的系统介绍中，融入多种英文表述形式。书中的标题及专业词汇有相应的英文标注，每章的开头设英文摘要（Abstract），帮助学生了解本章的主要内容，文中有重要内容的英文框（Box），每章最后有英文总结框图（Summary）及英文思考题（Review Questions），便于学生掌握本章的知识结构与重点。图、表均采用英文编排，书后附有文中与图表中出现的英文专业词汇及其中文对照，方便学生阅读时查阅。实验部分除了标题的英文标注之外，还将实验内容以英文概要（Essentials）的形式提炼出来，便于学生对实验总体过程的掌握。

本教材的编写得到了科学出版社的大力支持；赵彬涵完成了第二章、第三章和第五章大部分图表和方程式的收集和制作，王振完成了第七章部分内容的编写并对综合实验进行了完善，曲俊星参与了第三章、第四章部分图表的收集和制作，崔庆宇完成了第八章部分内容的编写，还有孔爽、梁敏、李哲、王越等的支持，在此一并致谢。

双语教材的编写是新形势下高校教学改革的重要内容，能将多年积累的教学素材整理出来，供求知若渴的学生们使用，实为一件有意义的工作。由于编者的学识、英文水平、经验和精力所限，虽经反复推敲与斟酌，不足和疏漏之处仍在所难免，诚请国内外同行、专家及广大读者指正。

赵 蕾

2018年1月

目 录

前言

上篇 理论部分

Theoretical Part

第一章 绪论	3
Introduction	3
第一节 酶学历史	4
History of Enzymology	4
第二节 酶工程历史	9
History of Enzyme Engineering	9
第三节 酶工程的主要内容	11
Main Topics of Enzyme Engineering	11
第四节 酶工程的任务	14
Tasks of Enzyme Engineering	14
第二章 酶的生产	17
Enzyme Production	17
第一节 酶的生产方法	18
Methods for Enzyme Production	18
第二节 酶生物合成及其调节	19
Enzyme Biosynthesis and Regulation	19
第三节 微生物发酵产酶	29
Enzyme Production by Microorganism	29
第四节 动植物细胞发酵产酶	38
Enzyme Production by Animal and Plant Cell Culture	38
第三章 酶的分离纯化	44
Isolation and Purification of Enzymes	44
第一节 粗酶液的制备	45
Preparation of Crude Enzymes	45
第二节 酶的纯化	51
Enzyme Purification	51
第三节 成品加工	95
Product Polishing	95

第四节	分离纯化策略	98
	Isolation and Purification Strategies	98
第四章	酶与细胞的固定化	104
	Immobilization of Enzyme and Cell	104
第一节	固定化酶(细胞)的产生	104
	Origin of Immobilized Enzyme (Cell)	104
第二节	固定化方法	107
	Methods of Immobilization	107
第三节	固定化酶(细胞)的性质与特点	115
	Properties and Characteristics of Immobilized Enzyme (Cell)	115
第四节	固定化技术的应用	119
	Applications of Immobilization Technology	119
第五章	酶分子的化学修饰	125
	Chemical Modification of Enzyme Molecules	125
第一节	酶的活性中心	125
	Enzyme Active Center	125
第二节	酶化学修饰的方法	128
	Methods for Chemical Modification of Enzyme	128
第三节	酶化学修饰的应用	134
	Applications of Chemical Modification of Enzyme	134
第六章	酶反应器	138
	Enzyme Reactor	138
第一节	酶反应器的类型	138
	Types of Enzyme Reactor	138
第二节	酶反应器的选择	143
	Selection of Enzyme Reactor	143
第三节	酶反应器的操作	145
	Operation of Enzyme Reactor	145
第七章	抗体酶与核酶	148
	Abzyme and Ribozyme	148
第一节	抗体酶	148
	Abzyme	148
第二节	核酶	154
	Ribozyme	154
第八章	生物酶工程	160
	Biological Enzyme Engineering	160
第一节	基因工程技术生产酶	160
	Enzyme Production by Genetic Engineering Technique	160

第二节 蛋白质工程改造酶	164
Enzyme Modification by Protein Engineering	164

下篇 实验部分

Experimental Part

综合性实验	171
Comprehensive Experiments	171
实验一 酵母蔗糖酶的纯化	171
Experiment I Purification of Yeast Sucrase	171
实验二 酵母蔗糖酶的纯度测定	174
Experiment II Purity Determination of Yeast Sucrase	174
实验三 酵母蔗糖酶的固定化	176
Experiment III Immobilization of Yeast Sucrase	176
实验四 固定化酵母蔗糖酶性质的研究	178
Experiment IV Properties of Immobilized Yeast Sucrase	178
实验五 利用固定化酵母蔗糖酶制备果葡糖浆	182
Experiment V Preparation of High Fructose Corn Syrup by Immobilized Yeast Sucrase	182
实验六 酵母蔗糖酶活性功能基团的化学修饰	184
Experiment VI Chemical Modification of Functional Groups in Yeast Sucrase	184
主要参考文献	188
References	188
英汉名词对照表	189
Terms in English and Chinese	189

上篇 理论部分

Theoretical Part

第一章 绪 论

Introduction

Enzymes are necessary in all living systems, to catalyze all chemical reactions required for their survival and reproduction—rapidly, selectively, and efficiently. The activities of enzymes have been recognized for thousands of years. The fermentation of sugar to alcohol by yeast is an example of a biotechnological process. Although the action and nature of enzymes began to be understood in the thirties of the 19th century, the recognition has been a continuous development and a step by step progress.

The excellent properties of enzymes have been utilized in enzyme technology. Their applications cover the production of many desired products for all human needs, such as chemicals, pharmaceuticals, fuel, food, or agricultural additives. But natural enzymes are not always perfectly suitable for industrial applications, as they might not be stable under process conditions or display low activity on alternative substrates. Fortunately, these properties can be efficiently optimized through enzyme engineering. Enzyme engineering is the applications of modifying enzyme structure (and, thus, its function) or improving catalytic activity of isolated enzymes to produce new metabolites, allow new (catalyzed) pathways for reactions to occur, or convert some compounds into others (biotransformation). Indeed, researches on enzymes have now entered a new phase with the fusion of ideas from protein chemistry, molecular biophysics, and molecular biology.

酶 (enzyme) 是具有生物催化功能的生物大分子, 存在于各种动物、植物及微生物细胞中, 没有酶就没有生命。酶催化具有高效性、专一性和作用条件温和等特点, 在医药、食品、化工、环保等领域应用广泛。

随着酶学研究的迅速发展, 酶学与工程学相互渗透结合形成了一门新的技术科学——酶工程, 它是酶的生产、改性与应用的技术过程, 是生物技术 (biotechnology) 的重要组成部分。

生物技术包括基因工程 (genetic engineering)、细胞工程 (cell engineering)、酶工程 (enzyme engineering) 和发酵工程 (fermentation engineering), 酶工程的主要任务是获得大量所需要的酶, 并进行高效利用, 是生物技术的核心。酶工程的主要内容包括酶的生产、酶的分离纯化、酶的固定化、酶反应器和酶的改造等。酶工程的应用遍及人类社会的各个领域, 日益受到世界各国的重视。

第一节 酶学历史

History of Enzymology

一、酶的发现 (Discovery of enzyme)

几千年前,人们就开始不自觉地利用酶的催化作用制造食品(酿酒、造酱等)和治疗疾病(用麴治疗消化不良),但并未真正认识到酶的存在。

1. 酶的获得 (Acquisition of enzyme)

1783年,意大利科学家 Spallanzani 通过实验发现,山鹰的胃液能将肉类分解消化,这可能是最早的酶催化实验。

1833年,法国科学家 Payen 和 Persoz 用乙醇处理麦芽提取物,得到一种能溶于水及稀乙醇,对热不稳定的白色无定形粉末,能使淀粉水解成可溶性糖,称之为淀粉酶 (diastase),这可以说是最早的酶制剂。

1836年,德国生理学家 Schwann 从胃中分离出一种消化蛋白质的物质,将其命名为胃蛋白酶,这是第一个从动物组织中提取到的酶。

2. 酶的命名 (Nomenclature of enzyme)

1716年(康熙五十五年)的《康熙字典》中就收录了“酶”字,并给出了“酶者,酒母也”这个确切的定义。酶乃酒之母,酒乃酶所生,表明我国学者对酶的作用已经有了初步认识,这比1876年德国科学家 Kühne 提出“enzyme”(来自希腊语,表示 in yeast, en 表示“在……之内”, zyme 表示酵母或酵素)这个词,早了100多年。

1898年, Duclaux 提出用 diastase (希腊语“分离”的意思)的最后三个字母“ase”作为酶命名的词根,如 oxide (氧化物) —oxidase (氧化酶), pectin (果胶) —pectinase (果胶酶)。

二、酶的作用 (Action of enzyme)

19世纪中叶,关于酵母在发酵中是如何起作用的问题展开了一场持续近60年的争论,德国化学家 Liebig 认为,乙醇发酵是一个自发过程,酵母是一个能产生震荡的物质。法国微生物学家 Pasteur 认为,发酵是活体细胞引起的一种生理活动,但直到两人去世谁也没能拿出说服对方的证据。

1897年,德国化学家 Buchner (Figure 1-1) 用石英砂磨碎酵母细胞,发现不含酵母细胞的抽提液也能使蔗糖发酵生成乙醇和二氧化碳,从而阐明了酶的作用是发酵的化学本质,奠定了现代生物化学的基石,并由此获得了1907年的诺贝尔化学奖。这是酶学研究史上第一次诺贝尔奖。



Box 1-1 Early concept of enzyme

The term “enzyme” (literally “in yeast”) was coined by Kühne in 1876. Yeast was

a popular subject of research due to its well-known importance in fermentation. A major controversy at that time, associated most memorably with Liebig and Pasteur, was whether or not the process of fermentation was separable from the living cells. Nobody believed in the necessity of vital forces until Buchner (1897) demonstrated that alcoholic fermentation could be carried out by a cell-free yeast extract.

The existence of extracellular enzymes had, for reasons of experimental accessibility, already been recognized. For example, as early as 1783, Spallanzani had demonstrated that gastric juice could digest meat *in vitro*, and Schwann (1836) called the active substance pepsin. In 1833, Payen and Persoz extracted an active substance from germinating barley which was even more effective than acid in starch hydrolysis. This substance could be precipitated with ethanol and was called diastase (a mixture of amylases).

三、酶的本质 (Nature of enzyme)

人类对酶化学本质的认识也是曲折的。20 世纪初, 德国化学家 Willstatter 认为, 酶不一定是蛋白质, 由于他的权威地位, 这种观点在当时较为流行。

1. 蛋白质酶 (Protein enzyme)

1926 年, 美国化学家 Sumner (Figure 1-2) 首次从刀豆中获得脲酶结晶, 并证明这种结晶能够催化尿素生成二氧化碳和氨, 由此提出了酶的化学本质是蛋白质的观点。



Figure 1-1 Eduard Buchner (1860—1919)

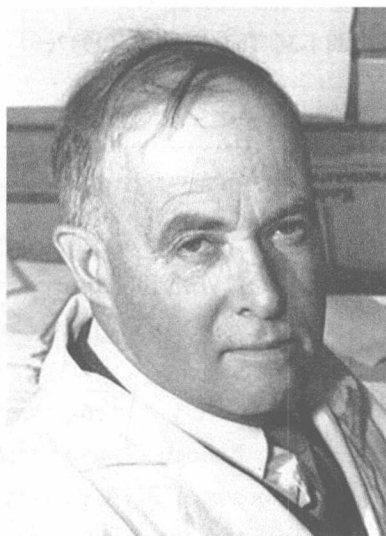


Figure 1-2 James Sumner (1887—1955)

但直到 20 世纪 30 年代, 美国生物化学家 Northrop 等得到了胃蛋白酶 (pepsin)、胰蛋白酶 (trypsin) 和胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) 的结晶, 并用相同方法证明了其化学本质都是蛋白质之后, Sumner 的观点才被普遍接受, 他们由此获得 1946 年的诺贝尔化学奖。这是酶学研究史上第二次诺贝尔奖。

2. 核酶 (Ribozyme)

1982年, Cech (Figure 1-3) 等发现四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 细胞的 26S rRNA 前体具有自我剪接 (self-splicing) 的功能, 这种具有催化活性的 RNA 称为核酶类酶。1983年, Altman (Figure 1-4) 等发现, 由 RNA 和蛋白质组成的核糖核酸酶 P (RNase P) 中的 RNA 组分具有催化活性, 而蛋白质部分却没有催化活性, 仅起维持构象的作用。这一发现, 改变了以往只有蛋白质才具有催化功能的概念, 为此, Cech 和 Altman 获得了 1989 年的诺贝尔化学奖。

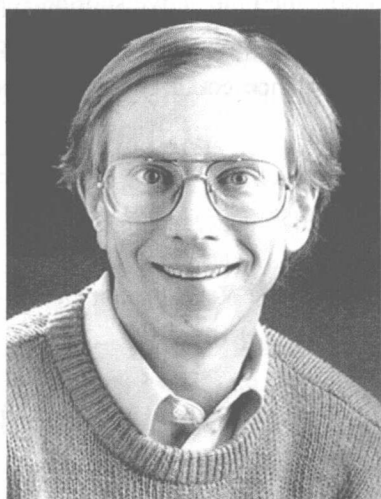


Figure 1-3 Thomas Cech (1947—)



Figure 1-4 Sidney Altman (1939—)



Box 1-2 The nature of enzyme

In 1926, James Sumner crystallized enzyme urease from jack bean meal and announced it to be a simple protein. With the conclusive work by John Howard Northrop, who worked on the digestive enzymes pepsin (1930), trypsin and chymotrypsin, the proteinaceous nature of enzymes was established.

Before the discovery of ribozymes, enzymes, which are defined as catalytic proteins, were the only known biological catalysts. In 1981, Thomas Cech was studying the excision of introns in a ribosomal RNA gene in *Tetrahymena thermophila*. While trying to purify the enzyme responsible for the splicing reaction, he found that the intron could be spliced out in the absence of any added cell extract. At about the same time, Sidney Altman and his colleagues isolated an enzyme called RNase P, which is responsible for conversion of a precursor tRNA into the active tRNA. Much to their surprise, they found that RNase P contained RNA besides protein and that RNA was an essential component of the active enzyme. Today we know that although the number of ribozymes is small, they are necessary for life. For example, the actual peptide synthase in ribosomes is a RNA.

四、酶学理论 (Theory of enzymology)

酶的研究是沿着理论与应用两个方向展开的。20 世纪初, 酶学研究得到迅速发展。按照时间顺序, 酶学理论的研究进展如下。

1. 锁钥学说 (Lock and key theory)

1894 年, Fischer (Figure 1-5) 提出了酶与底物作用的锁钥学说, 认为酶与底物分子之间在结构上有严格的互补关系, 可以解释酶作用的专一性。

2. 中间产物学说 (Intermediate theory)

1903 年, Henri 提出了中间产物学说, 酶与底物形成复合物, 从而降低了反应的活化能, 进而解释了酶的高效性。

3. 米氏方程 (Michaelis-Menten equation)

1913 年, Michaelis (Figure 1-6) 和 Menten (Figure 1-7) 根据中间产物学说, 导出了描述酶催化反应动力学的米氏方程。1925 年, Briggs 和 Haldane 对米氏方程进行了修正, 提出了稳态学说, 形成了酶催化反应的基本动力学方程——米氏方程。

4. 诱导契合学说 (Induced fit theory)

1958 年, Koshland (Figure 1-8) 提出了诱导契合学说, 即底物接近酶的活性中心时, 可诱导酶蛋白构象发生变化, 使之与底物成互补形状从而催化反应进行, 说明酶的活性中心在结构上具有柔性。

5. 操纵子学说 (Operon theory)

1960 年, Jacob (Figure 1-9) 和 Monod (Figure 1-10) 提出了操纵子学说, 阐明了酶生物合成的基本调节机制。



Figure 1-5 Emil Fischer (1852—1919)



Figure 1-6 Leonor Michaelis (1875—1949)



Figure 1-7 Maud Menten (1879—1960)

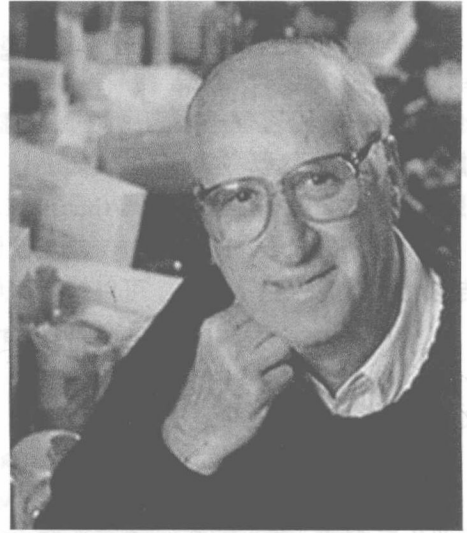


Figure 1-8 Daniel Koshland (1920—2007)



Figure 1-9 Francois Jacob (1920—2013)



Figure 1-10 Jacques Monod (1910—1976)

6. 酶活性中心 (Enzyme active center)

1965 年, Phillips 等用 X 射线晶体结构分析法研究了溶菌酶 (lysozyme) 的三维空间结构, 阐明了酶活性中心及其与底物的结合方式和作用机制。



Box 1-3 A brief history of enzymology

In 1902 the French chemist Victor Henri quantitatively described the relationship between

substrate concentration and reaction velocity for single substrate reactions. In 1913, the German chemist Leonor Michaelis and his Canadian postdoctor Maud Menten proposed a quantitative theory of Michaelis–Menten kinetics, which confirmed Henri’s result with much higher precision. Enzyme kinetics is the investigation of how enzymes bind substrates and turn them into products.

To explain the observed specificity of enzymes, in 1894 Emil Fischer proposed that both the enzyme and the substrate possess specific complementary geometric shapes that fit exactly into one another. This is often referred to as “the lock and key” model. This early model explains enzyme specificity, but fails to explain the stabilization of the transition state that enzymes achieve.

In 1958, Daniel Koshland suggested a modification to the lock and key model: since enzymes are rather flexible structures, the active site is continuously re-shaped by interactions with the substrate as the substrate interacts with the enzyme.

第二节 酶工程历史

History of Enzyme Engineering

酶学应用研究促进了酶工程概念的形成，酶的开发与利用是酶工程的主要内容之一。酶工程是利用酶的催化功能，借助工程手段将酶或细胞置于生物反应器中，将相应的原料转化为有用物质并应用于社会生产的一门技术，其主要目标是提高酶的使用效率，最终形成高效、经济的酶工程产业。

一、酶工程序幕 (Prelude of enzyme engineering)

应用研究促进了酶工程的形成，酶在工业上的大规模应用可以追溯到 19 世纪，是在以下成就中拉开序幕的。

1894 年，日本的高峰让吉 (Takamin) 利用米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的表面培养获得淀粉酶，用作消化药，并在多国申请了专利，为工业化生产真菌淀粉酶打下了基础。

1907 年，德国的 Röhm 从动物胰脏中提取得到胰酶，用于皮革的软化。

1911 年，美国的 Wallerstein 从木瓜中获得木瓜蛋白酶，用于啤酒的澄清。

1917 年，法国的 Boidin 利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 生产 α -淀粉酶，用于纺织品的脱浆。

1949 年，日本开始采用微生物液体深层培养方法生产细菌 α -淀粉酶，揭开了近代酶制剂工业的序幕。



Box 1-4 A story of enzyme application in leather manufacture

The use of isolated enzymes in the manufacture of leather played a major role in their

industrial-scale production. In 1898, Wood was the first to show that the bating action of the dung was caused by the enzymes (pepsin, trypsin, lipase) that it contained. In 1907, Röhm patented the application of a mixture of pancreatic extract and ammonium salts as a bating agent. As a chemist, Röhm's motivation was to find an alternative to the unpleasant bating practices using dungs.

Although the first tests with solutions of only ammonia failed, Röhm was aware of Buchner's studies on enzymes. He came to assume that enzymes might be the active principle in the dung, and so began to seek sources of enzymes that were technically feasible. His tests with pancreatic extract were successful, and on this basis in 1907 he founded his company, which successfully entered the market and expanded rapidly. During the 1920s, however, when insulin was discovered in pancreas, the pancreatic tissue became used as a source of insulin in the treatment of diabetes. Consequently, other enzyme sources were needed in order to provide existing enzymatic processes with the necessary biocatalysts, and the search successfully turned to microorganisms such as bacteria, fungi, and yeasts.

二、近代酶工程 (Enzyme engineering in modern times)

20 世纪 50 年代以来, 人们将液体深层培养技术应用于酶制剂的生产, 兴起了近代酶制剂工业, 其发展经历了三个里程碑。

(一) 工业应用 (Industry applications)

1. 葡萄糖淀粉酶 (Glucoamylase)

1959 年, 利用葡萄糖淀粉酶催化淀粉生产葡萄糖新工艺研发成功, 废除了酸解法生产葡萄糖的传统工艺, 提高了转化率, 极大地促进了酶在工业中的应用。

2. 碱性蛋白酶 (Alkali protease)

20 世纪 60 年代中期, 欧洲加酶洗涤剂的广泛流行, 使碱性蛋白酶的生产供不应求, 进一步促进了酶制剂工业的发展。

(二) 固定化酶 (Enzyme immobilization)

1. 固定化氨基酰化酶 (Immobilized amino-acylase)

1966 年, 日本千畑一郎成功地进行了氨基酰化酶的固定化, 并于 1969 年将其应用于工业生产, 将 DL-氨基酸拆分, 生产 L-氨基酸, 同年, “酶工程”这一名词开始使用。1971 年, 在美国召开的第一届国际酶工程学术会议, 正式采用固定化酶这一概念。

2. 固定化葡萄糖异构酶 (Immobilized glucose isomerase)

20 世纪 70 年代初, 美国成功地将固定化葡萄糖异构酶用于高果糖浆 (high fructose corn syrup) 的生产, 开创了利用淀粉生产食糖的新途径 (具体见第四章), 有力地推动了酶制剂工业和整个食品工业的发展。